

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
UFR de PHYSIQUE

THÈSE
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
(Arrêtés Ministériels du 5 Juillet 1984 et du 30 Mars 1992)

Spécialité : Cristallographie et RMN Biologiques

Présentée et soutenue publiquement par

Jacques-Philippe COLLETIER

Le 21 juillet 2006

ÉTUDE DES RELATIONS STRUCTURE – DYNAMIQUE – FONCTION
AU SEIN DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase

Composition du Jury

Présidente
Rapporteurs

Examineurs

Directeurs de thèse

Prof. Eva PEBAY-PEYROULA
Prof. Jean MASSOULIÉ
Dr. Jean-Pierre SAMAMA
Dr. Dominique BOURGEOIS
Prof. Didier FOURNIER
Prof. Israël SILMAN
Dr. Martin WEIK
Dr. Joseph ZACCAÏ

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble
(CEA-CNRS-UJF)

Remerciements :

Je tiens avant tout à remercier Martin WEIK, mon directeur de thèse, et principal soutien durant ces dernières années. Sa confiance, son aménité et son estime, depuis mon arrivée au laboratoire, sont pour beaucoup dans l'accomplissement de cette thèse. Du fond du coeur, je lui dis donc « Merci », pour tout, et notamment pour sa patience.

Je voudrais également remercier Joseph ZACCAÏ, mon co-directeur de thèse, pour sa gentillesse, sa passion communicative de la science et son ouverture d'esprit. Sa bonne humeur et son enthousiasme ont joué un rôle capital dans l'achèvement de cette thèse; je voudrais donc lui témoigner ma gratitude.

Je remercie Christine EBEL, directrice du laboratoire au sein duquel a été réalisée cette thèse (*i.e.* Laboratoire de Biophysique Moléculaire), pour sa prévenance, sa convivialité et son pragmatisme à toute épreuve. Je la remercie également de sa confiance et de son soutien concret au cours de ma dernière année de thèse.

Je remercie du fond du coeur Didier FOURNIER, pour sa confiance, sa gentillesse et son esprit. Force et plaisir sont de reconnaître, ici, que c'est à travers lui que mon « plongeon en Science » s'est opéré. Merci de m'avoir appris à voir ce travail comme un jeu, et de m'avoir introduit à ses règles.

Je voudrais spécialement remercier tous les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ma thèse, et plus particulièrement Jean-Pierre SAMAMA et Jean MASSOULIÉ, les deux rapporteurs, ainsi qu'Eva PEBAY-PEROULA, la présidente du Jury.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Adriana IRIMIA, qui m'a formé « pratiquement » en cristallographie, et à Frédéric VELLIEUX, pour ses conseils précieux en la matière.

Je voudrais faire part de ma reconnaissance à Dominique BOURGEOIS et Antoine ROYANT, et rendre hommage à leur affabilité, leur disponibilité et leur simplicité, durant nos cinq années de travail en commun.

Je remercie sincèrement Joël SUSSMAN et Israël SILMAN, ainsi qu'au sein de leurs laboratoires respectifs Harry M. GREENBLATT, Michal HAREL, Boris BRUMSHTEIN et Lilly TOKER, pour leur gentillesse et leur disponibilité dans le cadre de nos collaborations, ainsi que pour leur accueil chaleureux lors de mon séjour en Israël.

Je remercie Florian NACHON, Patrick MASSON et Jure STOJAN, pour la confiance qu'ils ont bien voulu de m'accorder dans le cadre de nos collaborations, mais aussi pour leur bienveillance et leur soutien.

Je remercie Johanne McCARTHY pour sa gentillesse, ainsi que pour son soutien concret aux projets de cette thèse. Je voudrais également exprimer ma gratitude à Elspeth GARMAN, John

McGEEHAN et Raimond RAVELLI, pour leur aide au cours de nos expériences et leurs encouragements.

Je remercie tous les collaborateurs des travaux décrits dans cette thèse et parmi eux, plus particulièrement, Alexandre SPECHT, Maurice GOELDNER et Guiseppe CAMPIANI.

Je remercie Benoît SANSON pour sa gentillesse et son amitié, ainsi que pour sa participation à la finalisation de certains des projets de cette thèse; je rends également hommage à son courage en ce qui concerne la durée de certaines de nos semaines de travail.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Biophysique Moléculaire, pour le plaisir que j'ai eu à travailler, à vivre, à sourire ou à rire avec eux; Marion JASNIN, Asun DURA, Nicolas COQUELLE, Emanuella FIORAVANTI, Eva ROSEMBAUM, Renata GZRELA, Antonina NASKALSKA et Izabella WOJTAL, je vous remercie tous pour votre amitié et votre soutien. Les soirées que nous avons passé ensemble compteront parmi les meilleurs souvenirs de cette thèse.

Je remercie plus particulièrement Katy WOOD, pour sa générosité, sa gentillesse et son affection.

Je remercie enfin ma famille pour leur soutien, leur patience et leur amour.
Maman, Charles et Nathalie, ce document vous est dédié; voyez-y l'expression de ma plus profonde affection, de mon admiration, de mon respect et de ma gratitude ...
Rien de ce qui s'y trouve n'y serait arrivé sans vous, car vous êtes comme l'air que je respire et qui me permet d'avancer ...

Sommaire

<u>I – Introduction générale</u>	1
<u>II – L’acétylcholinestérase (AChE)</u>	5
II-1 : Fonction classique, i.e. cholinergique	5
II-2 : Structure tridimensionnelle	9
II-2.1 : Le site actif	11
II-2.2 : La gorge aromatique	13
II-2.3 : Le site périphérique	15
II-3 : Mécanisme catalytique et comportement cinétique	16
II-4 : Implication de l’AChE dans la maladie d’Alzheimer	23
<u>III – Cristallographie aux rayons X</u>	29
III-1 : Introduction	29
III-2 : Bases théoriques de la cristallographie monochromatique des protéines	30
III-2.1 : Loi de Bragg	31
III-2.2 : Sphère d’Ewald et réseau réciproque	34
III-2.3 : La transformée de Fourier	36
III-3 : Aspects pratiques de la cristallographie aux rayons X	38
III-3.1 : Cristallisation d’une protéine	40
III-3.2 : Montage de cristaux en vue d’une expérience de diffraction	42
III-3.3 : Collecte de données cristallographiques	44
III-3.4 : Dommages d’irradiation X	48
III-3.5 : Traitement de données cristallographiques	49
III-3.6 : Résolution d’une structure cristallographique	52
III-3.7 : Affinement d’une structure cristallographique	56

<i>III-3 : La cristallographie cinétique</i>	58
III-3.1 : État de l’art	58
III-3.2 : Pré-requis en vue d’une étude de cristallographie cinétique	62
<u>IV – Objectifs de la thèse</u>	65
<u>V – Matériels et Méthodes</u>	59
<i>V-1 : Structure de l’AChE en complexe avec un anti-Alzheimer potentiel, le NF595</i>	69
V-1.1 : Matériel chimique	69
V-1.2 : Cristallisation de la TcAChE	69
V-1.3 : Procédures de trempage	70
V-1.4 : Collectes de données cristallographiques	70
V-1.5 : Résolution des structures et affinements	71
<i>V-2: Étude du trafic des substrat et produits au sein de l’AChE</i>	72
V-2.1 : Matériel chimique	72
V-2.2 : Cinétique d’hydrolyse de l’ATCh	72
V-2.3 : Cristallisation de la TcAChE	73
V-2.4 : Procédures de trempage	73
V-2.5 : Collectes de données cristallographiques	73
V-2.6 : Résolution des structures et affinement	74
<i>V-3 : Méthodologie en cristallographie cinétique</i>	77
V-3.1 : Composés cagés (CC)	77
V-3.2 : Cristallisation de la TcAChE, choix de la forme cristalline et procédures de trempage	77
V-3.3 : Cryophotolyse et microspectrophotométrie in-cristallo	78
V-3.4 : Collectes de données cristallographiques	81

V-3.4.1 : Structure du complexe <i>TcAChE</i> /CC non-photolysé	81
V-3.4.2 : Recuit à température ambiante (RTA)	81
V-3.4.3 : Effet du RTA sur la structure du complexe <i>TcAChE</i> /CC non-photolysé	82
V-3.4.4 : Dommages induits par les UV à température ambiante sur la <i>TcAChE</i> native	82
V-3.4.5 : Structure du complexe <i>TcAChE</i> /CC photolysé après RTA	83
V-3.5 : Résolution des structures et affinement :	84
V-3.5.1 : Complexes <i>TcAChE</i> /CC	84
V-3.5.2 : <i>TcAChE</i> native endommagée par les UV	86
<u>VI – Résultats</u>	78
<i>VI-1 : Conformational flexibility in the peripheral site of Torpedo californica acetylcholinesterase revealed by the complex structure with a bifunctional inhibitor</i>	91
<i>VI-2 : Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase</i>	101
<i>VI-3 : Kinetic crystallography on acetylcholinesterase</i>	131
<i>VI-4 : Exploration structurale du paysage conformationnel de l'acétylcholinestérase par cristallographie cinétique</i>	163
<u>VII – Discussion, conclusion et perspectives</u>	183
<u>VIII – Références</u>	191
<u>IX – Annexes</u>	215
<i>IX-1 : Stojan et al., 2004</i>	217
<i>IX-2 : Colletier et al., 2006a</i>	225
<i>IX-3 : Colletier et al., 2006b</i>	227

Chapitre I :

Introduction générale

I – Introduction :

L'acétylcholinestérase (AChE) est une protéine exprimée dans les système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs. Si au sein du système circulatoire, son rôle physiologique reste encore à élucider, sa fonction principale, au sein du système nerveux, est parfaitement caractérisée. L'AChE est une protéine exprimée au sein des synapses dites cholinergiques, *i.e.* qui utilisent le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement, etc). L'AChE hydrolysera à ces divers loci le neurotransmetteur ACh (Schéma 1), terminant ainsi la transmission de l'influx nerveux et restaurant, de fait, l'excitabilité de ces synapses. De sa vitesse d'hydrolyse dépendra donc la rapidité de transmission des influx nerveux ; ainsi, l'AChE est parmi les enzymes les plus rapides de la Nature, avec un turn-over de 1000 à 20000 molécules par secondes selon l'espèce considérée.

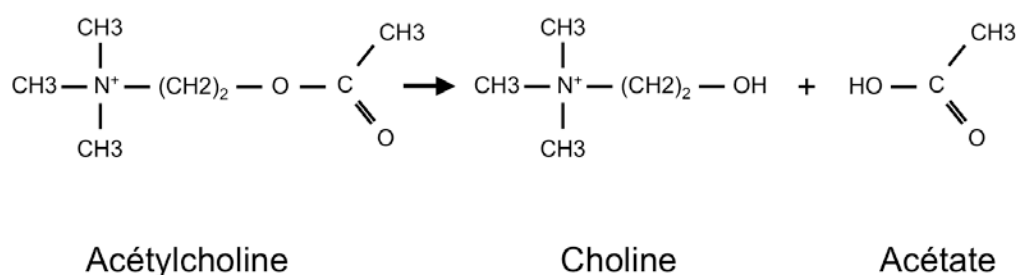


Schéma 1.

Très tôt (Allès & Hawes, 1940), et depuis lors constamment, des efforts considérables ont été fournis pour comprendre le mécanisme de fonctionnement de cette enzyme, élucider sa structure et moduler son activité. L'AChE est en effet impliquée dans divers problèmes majeurs de santé publique (maladie d'Alzheimer, myasthénie, intoxication aux insecticides,

aux gaz neurotoxiques, au venin de serpents Mamba ou au curare) ; une meilleure compréhension de son mécanisme d'action pourrait donc apporter des informations utiles en vue d'en résoudre certains. Si des progrès considérables ont été possibles grâce aux travaux concertés en biologie, biochimie et cristallographie aux rayons X, un problème fondamental persiste. Ce dernier a paradoxalement été posé par la publication de la première structure d'AChE (Sussman *et al.*, 1991), celle du poisson torpille *Torpedo californica* (TcAChE), qui a révélé que le site actif était enfoui au fond d'une gorge profonde (20 Å de longueur environ) et étroite (environ 5 Å à mi-hauteur). Étant donnée sa vitesse de catalyse, il est en effet surprenant que le site actif de l'AChE soit à ce point confiné au sein de la structure. Le diamètre de la gorge à mi-hauteur, observé dans la structure native, est juste assez large pour permettre le passage d'une molécule d'eau, et il ne devrait donc théoriquement pas autoriser l'accès d'une molécule de substrat, *i.e.* d'ACh, au site actif de l'enzyme. Sachant qu'un ion tétraméthylammonium (TMA) isolé correspond à une sphère de van der Waals de 6.4 Å de diamètre, il est évident qu'une flexibilité conformationnelle de l'enzyme sera requise, à divers instants de la catalyse, pour permettre l'entrée des substrats et la sortie des produits. Les alignements de séquence, puis la résolution des structures des AChEs de souris (mouse AChE ou mAChE – Bourne *et al.*, 1995), de Drosophile (*Drosophila melanogaster* AChE ou DmAChE – Harel *et al.*, 2000) et enfin humaine (huAChE – Kryger *et al.*, 2000) ont confirmé l'enfouissement des sites actifs des AChEs, et ce quelle que soit l'espèce considérée.

Ces constatations ont soulevé une multitude d'interrogations quant aux bases structurales et dynamiques de l'efficacité catalytique des AChEs. L'entrée des substrats, l'hydrolyse à proprement parler puis la sortie des produits, devront être, chacune, extrêmement rapides, et par ailleurs concertées, pour que l'enzyme puisse atteindre une vitesse de catalyse de l'ordre du millier de molécules de substrat par seconde. D'un point de vue purement mécanistique, la

présence de la gorge, tel un goulet d'étranglement, se corrèle difficilement avec un turn-over de cette importance. De fait, une flexibilité conformationnelle de l'enzyme, et plus particulièrement de la gorge menant à son site actif, doit exister pour que la catalyse puisse avoir lieu. Il a été proposé, par ailleurs, que le produit choline puisse quitter le site actif de l'enzyme par un chemin de sortie alternatif (ou « back-door » - Gilson *et al.*, 1996), laissant ainsi la gorge libre pour l'entrée des substrats. Différentes observations appuient l'existence d'un chemin annexe à la gorge, pour l'entrée des substrats ou la sortie des produits (Marchot *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Bartolucci *et al.*, 1999), mais toutes les campagnes de mutagenèse dirigée ont conclu en sa non-nécessité pour expliquer la cinétique enzymatique (Kronman *et al.*, 1994; Velan *et al.*, 1996; Faerman *et al.*, 1996). Une preuve expérimentale directe serait nécessaire pour confirmer ou infirmer l'existence de cette « back-door » ; elle reste manquante.

Au cours de cette thèse, nous avons voulu explorer le paysage conformationnel de l'AChE afin de décrire, structuralement, le trafic des substrats et produits en son sein. Pour ce faire, nous avons utilisé trois approches différentes de la cristallographie aux rayons X : « statique », « quasi-statique » et « cinétique ».

Certains ligands ont la faculté de sous-sélectionner une conformation particulière dans le paysage conformationnel d'une enzyme. De fait, la structure « statique » d'un complexe avec un ligand peut parfois renseigner sur la dynamique d'une enzyme. La structure de la TcAChE en complexe avec un médicament anti-Alzheimer potentiel, le NF595, a révélé que celui-ci induit un changement conformationnel majeur au niveau de son site périphérique. Ce travail sera décrit dans la première partie des résultats.

Grâce à une approche de mise à l'équilibre réactionnel, ou « steady-state », et en combinaison avec des études biochimiques, nous avons pu suivre le trafic des substrats et produits dans la gorge de la *TcAChE*. Cette étude sera décrite dans la deuxième partie des résultats.

L'approche cinétique, quant à elle, aura nécessité le développement et l'application d'une stratégie nouvelle en cristallographie cinétique. Notre méthode est basée sur l'utilisation de « cholines-en-cage », *i.e.* des précurseurs photosensibles (dans le domaine UV-visible) de la choline, un des deux produits d'hydrolyse de l'ACh. Cette méthode, et les résultats obtenus en l'appliquant, seront présentés dans la troisième partie des résultats.

Chapitre II :

L'acétylcholinestérase

II – L'acétylcholinestérase (AChE):

II-1 – Fonction « classique », i.e cholinergique :

Les molécules d'ACh qui participent à la transmission d'un influx nerveux donné doivent être dégradées très rapidement, en quelques millisecondes, afin de restaurer l'excitabilité neuronale et ainsi permettre la transmission de l'influx nerveux suivant. Cette fonction essentielle est assurée par l'AChE laquelle, en accord avec sa fonction, est parmi les enzymes les plus rapides de la nature. Son turn-over (k_{cat}) est, en moyenne, de 10.000 molécules de substrat hydrolysées par seconde (entre 1000 et 20000 s⁻¹, selon l'espèce considérée), et son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) d'environ 1.5 x10⁸M⁻¹.s⁻¹ : la diffusion de substrats et de produits, vers et à partir du site actif, constitue pratiquement l'étape limitante de la réaction d'hydrolyse (Rosenberry, 1975 ; Quinn, 1987). La limite théorique pour l'efficacité catalytique d'une enzyme est estimée entre 10⁸ et 10⁹M⁻¹.s⁻¹. ; l'AChE peut donc être considérée comme « cinétiquement » ou « catalytiquement » parfaite. Il faut noter, cependant, que d'autres enzymes moins rapides peuvent également être considérées comme « catalytiquement » parfaites au regard de leur efficacité catalytique; c'est le cas, entre autres, de la catalase, de la fumarase, de la β-lactamase ou de la superoxide dismutase.

Les déterminants moléculaires de la perfection catalytique de l'AChE ont été élucidés grâce à d'extensives études de mutagenèse dirigée (Gibney *et al.*, 1990 ; Fournier *et al.*, 1992a ; Fournier *et al.*, 1992b ; Mutero *et al.*, 1992 ; Shafferman *et al.*, 1992a,b ; Duval *et al.*, 1992 ; Harel *et al.*, 1992 ; Vellom *et al.*, 1993 ; Ordentlich *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Shafferman *et al.*, 1994 ; Kronman *et al.*, 1994 ; Ordentlich *et al.*, 1995 ; Masson *et al.*, 1996 ; Radic *et al.*, 1997 ; Ordentlich *et al.*, 1998 ; Szegletes *et al.*, 1998 ; Morel *et al.*,

1999 ; Brochier *et al.*, 2001 ; Kaplan *et al.*, 2001 ; Barak *et al.*, 2002 ; Frémaux *et al.*, 2002 ; Clery-Barraud *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2004 ; Kaplan *et al.*, 2004), et au nombre considérable de structures cristallines d'AChEs natives ou en complexe avec différents inhibiteurs (Sussman *et al.*, 1991 ; Harel *et al.*, 1993 ; Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1996 ; Kryger *et al.*, 1998 ; Bourne *et al.*, 1999 ; Felder *et al.*, 2002 ; Bourne *et al.*, 2003 – liste non exhaustive). Ainsi, il a pu être mis en évidence que l'AChE possédait deux sites de fixation, le site catalytique et le site périphérique. Le site actif est enfoui au fond d'une gorge profonde et étroite, à l'entrée de laquelle se trouve le site périphérique (Figures 1 et 2). La première étape de la catalyse enzymatique serait la fixation du substrat sur ce site (Szegetes *et al.*, 1998), d'où il glisserait ensuite vers le site actif pour être hydrolysé. Concernant la fixation d'un substrat sur le site périphérique, néanmoins, aucune preuve structurale n'a été apportée. De même, le mode de fixation du substrat dans le site actif de l'enzyme n'a jamais été observé, mais prédit ; une confirmation expérimentale serait donc bienvenue.

Dans le site actif se trouve la machinerie catalytique de l'enzyme (Figure 3) ; celle-ci comprend :

- la triade catalytique (résidus Ser200, His440 et Glu327 – numérotation pour la TcAChE dans tous le document, sauf contre-indication), responsable de l'hydrolyse de l'ACh, à proprement parler.
- le sous-site anionique (résidus Trp84, Glu199 et Phe330), qui stabilise la portion choline (Ch) de la molécule d'ACh.
- le trou oxyanion (résidus Gly118, Gly119 et Ala201), qui favorise la formation de l'intermédiaire tétraédrique en accueillant l'oxygène négativement chargé de son carbonyle.
- la poche acyle (résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331), qui stabilise le groupement méthyle de la portion acétate durant toute la catalyse.

En accord avec son rôle physiologique clé, l'AChE est la cible d'une gamme très large de molécules actives, parmi lesquelles autant de toxines naturelles que de poisons de confection humaine. Les différents inhibiteurs de l'AChE interagissent soit directement dans son site actif, et dans ce cas, en se liant de façon covalente (inhibition irréversible) ou non-covalente (inhibition réversible) ; soit au niveau de son site périphérique (inhibition réversible). L'inhibition irréversible de l'AChE entraînera, d'une façon générale, la mort de l'individu concerné ; mais son inhibition réversible, si elle est maîtrisée, peut être bénéfique.

Parmi les toxines naturelles pouvant inhiber l'AChE se trouvent notamment la fasciculine (Marchot *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994, 1995 ; Eastman *et al.*, 1995), un peptide trouvé dans le venin des serpents « mambas », et la *d*-tubocurarine, qui interagit aussi avec le récepteur nicotinique, un des deux types de récepteurs synaptiques à ACh (les récepteurs à ACh sont nommés nicotinique et muscarinique, respectivement, en accord avec la substance qui a, historiquement, permis leur mise en évidence (nicotine et muscarine)). Ces deux inhibiteurs se fixent avec une haute affinité au site périphérique de l'enzyme et l'inhibent donc en bloquant physiquement l'accès au site actif. En ce qui concerne la fasciculine, ce mode d'inhibition a été structuralement confirmé (Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Kryger *et al.*, 2000). On trouve également, parmi les inhibiteurs naturels de l'AChE, différents alcaloïdes (par exemple la galanthamine, la gallamine ou l'(-)-huperzine A), dont certains sont utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Parmi les inhibiteurs de l'AChE de fabrication humaine, on trouve majoritairement des molécules appartenant à la famille des organophosphorés (OP) ou à celle des carbamates (CBM). La plupart des insecticides utilisés de nos jours appartiennent en effet à ces deux familles de molécules organiques (OP : par exemple, le chlorpyrifos, le dichlorvos ou le

malathion ; CBM : par exemple, le propoxur). On compte également, parmi les OP, les gaz neurotoxiques à usage militaire comme le VX, le tabun, le soman ou le sarin. Ces deux types de molécules sont en fait plus des substrats de l'AChE, que des inhibiteurs au sens propre. Cependant, la décarbamylation (CBM) et la déphosphorylation (OP) de la sérine catalytique (*i.e.* la réaction équivalant à la déacetylation dans le contexte physiologique de l'hydrolyse de l'ACh) ont lieu sur des échelles de temps plus longues ; de l'ordre de la minute, pour la décarbamylation, et de l'ordre de l'heure, pour la déphosphorylation. A ceci s'ajoute, dans le cas de certains OP, une réaction secondaire de vieillissement, qui correspond à une déalkylation de la phosphonyl-enzyme et qui rend, par la suite, la régénération de l'enzyme libre impossible ; l'enzyme est alors inactivée de façon irréversible.

Bien heureusement, le bio-mimétisme des activités humaines ne se limite pas uniquement à la conception de poisons plus violents que leurs homonymes naturels. Ainsi, on utilise aujourd'hui les inhibiteurs de cholinestérases afin de soigner diverses maladies, parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer ou la myoasthénie. Ces affections sont en effet liées à des déficits cholinergiques (voir plus loin). Une inhibition réversible de l'AChE pourra donc être bénéfique car elle permettra une augmentation temporaire de la concentration synaptique en ACh. Certains inhibiteurs de l'AChE sont également utilisés en anesthésie, par exemple la *d*-tubocurarine ou la succinylcholine. Enfin, plusieurs équipes à travers le monde travaillent sur le développement de biosenseurs basés sur l'AChE en vue de détecter, de façon plus fiable et plus rapide, des taux d'insecticides élevés dans l'environnement et les produits cultivés (Marty *et al.*, 1992 ; Colletier *et al.*, 2002 ; Chaize *et al.*, 2004).

II-2 – Structure tridimensionnelle :

La première structure tridimensionnelle résolue d'une AChE fut celle de l'AChE du poison torpille *Torpedo californica* (Sussman *et al.*, 1991 – Figure 1). L'AChE exprimée dans l'organe électrique de *Torpedo californica* est un dimère, ancré dans la membrane *via* un lien glyco-phosphatidyl-inositol. En préalable de la cristallisation, cette forme de l'enzyme doit donc être digérée par une phospholipase de type C, spécifique au phosphatidylinositol. Si cette structure a répondu à nombres d'interrogations posées par la biologie moléculaire et la biochimie, elle a paradoxalement rendu plus difficile la compréhension du mécanisme catalytique de l'AChE. En révélant la localisation du site actif de l'AChE au fond d'une gorge profonde (env. 20 Å) et étroite (env. 5 Å), cette structure a en effet soulevé de nouvelles interrogations quant à l'organisation du trafic des substrats et produits, au sein de l'enzyme (Figure 2). L'enfouissement du site actif de l'AChE semble difficilement compatible avec sa vitesse de catalyse : comment concevoir, en effet, que puissent transiter, chaque seconde, 1000 à 20000 molécules d'ACh et, par conséquent, la même quantité de Ch et d'acide acétique, au travers d'une gorge aussi profonde et rétrécie.

La structure publiée en 1991 était celle du dimère entier d'AChE. Chaque monomère est constitué de 11 feuillets β et de 15 hélices α , ainsi que d'une courte portion de feuillet β , à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure. Le repliement global de l'enzyme est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases (Ollis *et al.*, 1992). Dans le dimère, les deux monomères sont liés, l'un à l'autre, par un « paquet » de 4 hélices α (ou « 4-helix bundle ») : deux hélices α de chaque monomère, dont l'hélice α C-terminale, participent à la mise en place d'un accollement inter-résidus très stable. Les cystéines C-terminales (Cys537) de chacun des deux monomères établissent entre elles un pont disulfure inter-chaînes qui stabilisera, covalamment, cette

interface de dimérisation. On distingue, dans un monomère d'AChE, deux domaines indépendants l'un de l'autre, et disposé de part et d'autre de la gorge menant au site actif. Ces domaines correspondent en fait aux deux moitiés de la chaîne polypeptidique : le domaine constitué des résidus 1 à 305 s'accroche en effet sur l'autre, constitué des résidus 306 à 537 (Morel *et al.*, 1999).

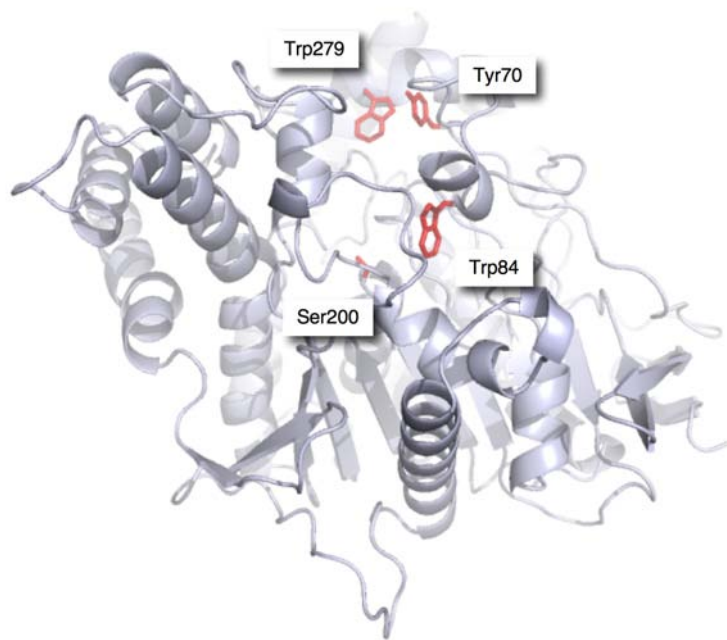


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la *TcAChE* montrant la sérine catalytique (Ser200), le principal contributeur à la stabilisation de l'ACh dans le site actif (Trp84), et les deux principaux constituants du site périphérique (Trp279, Tyr70) (PDB id. : 1EA5).

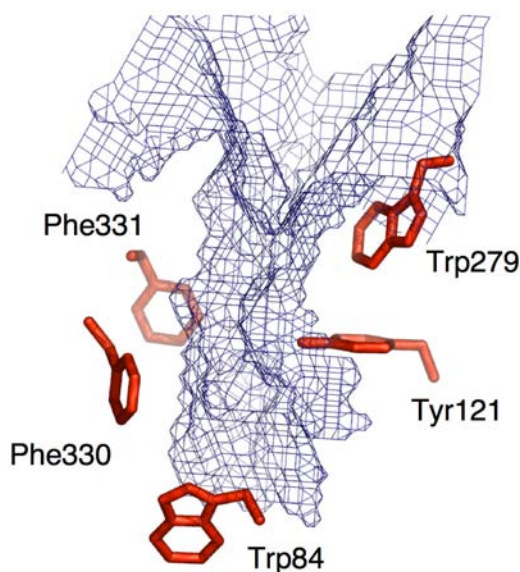


Figure 2 : La gorge menant au site actif de la *TcAChE*. Les principaux constituants du site actif (Trp84) et du site périphérique (Trp279) sont montrés, ainsi que les trois résidus responsables du rétrécissement à mi-hauteur de la gorge (Tyr121, Phe330 & Phe331). La grille représente l'accessibilité du solvant (rayon de 1.4 Å pour la sonde, *i.e.* la taille d'une molécule d'eau) le long de la gorge.

L'examen plus détaillé de la structure atomique de l'AChE révèle l'existence de deux zones essentielles pour la catalyse enzymatique : le site périphérique, à l'entrée de la gorge, et le site actif, au fond, où se trouve la machinerie catalytique. Le site actif et le site périphérique seront ainsi deux cibles potentielles en vue de l'inhibition de l'AChE par des composés toxiques ou thérapeutiques.

II-2.1 : Le site actif :

La machinerie catalytique de l'AChE se trouve au fond d'une gorge profonde et étroite. On distingue deux sous-sites : le site anionique et le site estérasique.

Le site estérasique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire enzyme acylée. Ensuite a lieu la déacétylation, qui régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate. La triade catalytique est composée des résidus Ser200, Glu327 et His440 (Figure 3). C'est au niveau de la sérine catalytique que se fixe la portion carbonyle de la molécule d'ACh. L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique. Grâce à son noyau imidazole, elle établit deux liaisons hydrogènes avec la Ser200 et le Glu327 qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement.

L'enzyme devra pouvoir stabiliser l'oxygène du carbonyle de l'ACh, qui se charge négativement lors de la formation de l'intermédiaire tétraédrique. De fait, une poche est présente dans le site actif de l'enzyme, qu'on nomme le trou « oxyanion », et qui est constituée des résidus Gly118, Gly119 et Ala201 (Figure 3). De même, il sera important de stabiliser le groupement méthyle du carbonyle de l'ACh, puis de l'acétate, durant les deux

étapes capitales de la catalyse – *i.e.* l'acylation de l'enzyme avec départ concomitant de la choline, puis sa déacylation, afin de la régénérer. Ainsi on trouvera également, dans le sous-site estératique, une petite cavité hydrophobe nommée la « poche acyle », constituée des résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331 (Figure 3). Cette poche joue un rôle essentiel dans la sélectivité de substrat de l'AChE, qui ne pourra hydrolyser efficacement que les esters pouvant loger leur portion aliphatique dans cette poche. Ainsi, il a été montré que le remplacement, par mutagenèse dirigée, des résidus aromatiques qui constituent cette cavité, par des résidus hydrophobes moins encombrants car non-aromatiques, confère une spécificité de substrat plus large à l'AChE (Harel *et al.*, 1992).

Le site anionique tient son nom plus de l'histoire que de sa réalité propre. En effet, l'ACh portant une charge positive, il avait été postulé que le site actif de l'AChE puisse être constitué par un amas de résidus acides (chargés négativement au pH physiologique) qui aurait eu la charge de stabiliser le substrat durant la catalyse. En réalité, ce site au niveau duquel la portion tétraméthylammonium (TMA) du substrat sera stabilisée est plutôt aromatique qu'anionique ; il est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330 (Figure 3). La charge positive du ligand sera effectivement stabilisée par l'attraction électrostatique du résidu Glu199, mais le sera beaucoup plus effectivement par son interaction avec les électrons π des noyaux aromatiques environnant (Verdonk *et al.*, 1993 ; Dougherty, 1996). Ce sous-site anionique est capital pour la catalyse : on estime que plus de 50% de l'énergie de stabilisation du substrat lui est directement imputable (Harel *et al.*, 1996). Les résidus Trp84 et Phe330 seront les deux plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation.

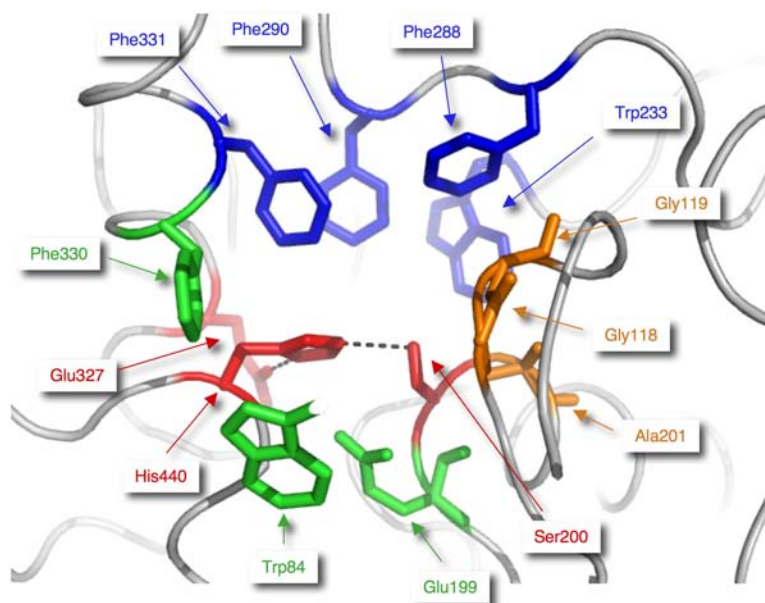


Figure 3 : Vue détaillée du site actif de la *TcAChE*, montrant les résidus de la triade catalytique (rouge – Ser200, His440 & Glu327), du trou oxyanion (orange – Gly118, Gly119 & Ala201), de la poche acyle (bleu – Trp233, Phe288, Phe290 & Phe331) et du site anionique (vert – Trp84, Glu199, Phe330). Les pointillés représentent les liaisons hydrogènes entre les partenaires de la triade catalytique.

II-2.2 : La gorge aromatique :

La gorge qui mène de la surface de l'enzyme à son site actif est profonde d'environ 20 Å (Figure 2). Elle est principalement tapissée par les chaînes latérales de résidus aromatiques ; ceux-ci pourraient jouer un rôle dans le positionnement ou le guidage des molécules d'ACh vers le site actif. Dans la structure native, on observe un rétrécissement à mi-hauteur de la gorge, qui va réduire l'accès au site actif. Celui-ci est mis en place par trois résidus hydrophobes qui forment un goulet d'étranglement dans la gorge, *viz.* la Tyr121, la Phe330 et la Phe331. Si l'on considère cette structure comme statique, et si on admet que seul l'espace autorisé par les sphères de van der Waals des résidus impliqués dans la formation du goulet (environ 3 Å) est accessible, alors seule une molécule d'eau pourrait accéder au site actif de l'enzyme. Une flexibilité conformationnelle de l'enzyme, et notamment de sa gorge, doit être envisagée, afin de concevoir que les substrats et *de facto*, les produits, puissent entrer et sortir

du site actif. La dynamique de ce « gating » doit par ailleurs être adaptée au turn-over important de l'enzyme.

La distribution de charge de l'AChE est une autre particularité intéressante de cette enzyme (Figure 4). Au pH physiologique, la macromolécule présente un très fort moment dipolaire, aligné le long de la gorge ; celui-ci pourrait jouer un rôle dans l'attraction de l'ACh vers le site périphérique, puis son guidage vers le site actif (Ripoll *et al.*, 1993). La plupart des résidus acides responsables de la mise en place de ce dipole sont situés à l'extérieur de la gorge et distribués sur le pourtour de son entrée. La mutation de l'un ou plusieurs de ces résidus n'entraînant que des variations légères dans les propriétés catalytiques de l'enzyme (Shafferman, 1994), il a été suggéré que la distribution de charge globale de l'AChE soit en fait assez peu impliquée dans son efficacité catalytique. Néanmoins on trouve, à l'intérieur de la gorge, trois résidus dont la mutation entraînera une diminution notable de l'efficacité catalytique de l'enzyme (Asp72, dans la portion supérieure ; Glu199 et Glu443, dans la portion inférieure – Radic *et al.*, 1997). Ces résidus semblent donc jouer un rôle non négligeable dans l'attraction du substrat positivement chargé vers le haut de la gorge, son guidage vers le site actif et/ou sa stabilisation lors de la catalyse.

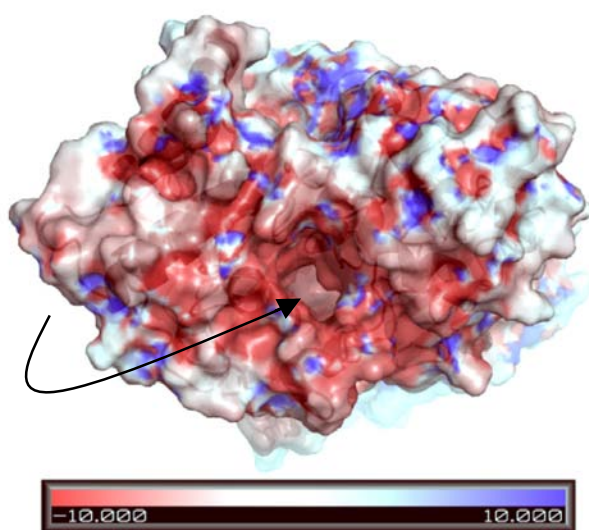


Figure 4 : Distribution de charge sur le pourtour de l'entrée de la gorge de la TcAChE. La flèche noire indique l'entrée de la gorge. La surface moléculaire est colorée en fonction de la charge, exprimée en kT (calcul pour une force ionique nulle à 298 K, en utilisant le programme APBS (Baker *et al.*, 1998)).

II-2.3 : Le site périphérique :

Il a été montré, depuis bientôt plus de deux décennies, que l'AChE possédait, à l'entrée de la gorge menant au site actif, un autre site de fixation pour ses substrats et/ou ligands, le site périphérique. Ce site, constitué des résidus Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 et Tyr334 dans la TcAChE (Figure 5), est très conservé parmi les AChEs. Le résidu le plus important dans la constitution de ce site est le Trp279, qui n'a jusqu'ici été recensé comme absent qu'au sein de l'AChE de poulet (Eichler *et al.*, 1994). La caractérisation biochimique du site périphérique a été possible grâce à des expériences de mutagenèse dirigée ainsi que grâce aux mesures d'affinités et de compétition avec le substrat de ligands spécifiques du site périphérique comme le propidium, le BW284C51, la *d*-tubocurarine ou encore la fasciculine du venin de mamba (Radic *et al.*, 1991 ; Barak *et al.*, 1994 ; Eichler *et al.*, 1994 ; Radic *et al.*, 1994 ; Radic *et al.*, 1995). Il a aussi été caractérisé structuralement suite aux résolutions de différentes structures de l'AChE en complexe avec le décarnéthonium (Harel *et al.*, 1993), la fasciculine (Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Kryger *et al.*, 2000) ou des inhibiteurs synthétiques spécifiques du site périphérique (Bourne *et al.*, 2003 ; Bourne *et al.*, 2004). Etant donné qu'à haute concentration, l'ACh perturbe la fixation des ligands ou inhibiteurs spécifiques du site périphérique de l'AChE, il a été proposé que leurs sites de fixation soient équivalents, ou du moins partiellement confondus (Radic *et al.*, 1991 ; Barak *et al.*, 1994 ; Eichler *et al.*, 1994 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1997 ; Rosenberry *et al.*, 1999). La fixation de l'ACh au site périphérique de l'AChE acétylée, *i.e.* à la forme prédominante de l'enzyme à basse concentration de substrat, peut entraîner une accélération de la catalyse (Brochier *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2003), résultant en une activation par le substrat. Il faut noter cependant que la mise en évidence de cette activation par le substrat dépend très fortement du pH et de la force ionique du milieu réactionnel, et que la réalité

« inter-espèce » de ce phénomène est encore discutée. L'inhibition de l'AChE par les hautes concentrations de son substrat l'est beaucoup moins, puisqu'elle se rencontre sur toutes les AChEs, et ce, quelles que soient les conditions expérimentales ou les substrats considérés. Tous les modèles cinétiques actuels s'accordent sur la participation du site périphérique dans le phénomène d'inhibition par le substrat. Des discussions persistent néanmoins quant à son degré d'implication (Radic *et al.*, 1991 ; Shafferman *et al.*, 1992 ; Eichler *et al.*, 1994 ; Rosenberry *et al.*, 1999 ; Stojan *et al.*, 2004 – voir plus loin).

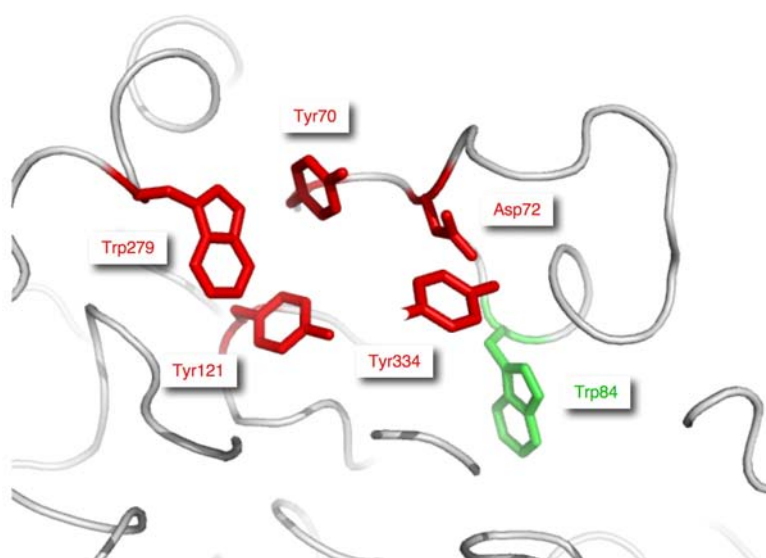


Figure 5 : Vue détaillée du site périphérique de la TcAChE. Les résidus déterminant le diamètre d'ouverture de la gorge sont montrés (en rouge – Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 et Tyr334), ainsi que le principal constituant du site anionique (en vert – Trp84).

II-3 – Mécanisme catalytique et comportement cinétique :

L'AChE (acétylcholine acétyl hydrolase – EC 3.1.1.7) est une carboxylestérase de type B, appartenant à la famille des sérines hydrolases (Quinn, 1987 ; Taylor & Radic, 1994). Cette famille comprend, entre autres, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Les sérines hydrolases sont considérées comme des enzymes relativement rapides et efficaces, étant donnés leur mécanisme catalytique et le « design » approprié de leur site actif ; on y trouvera en effet toujours une poche responsable de la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique,

appelée « trou oxyanion », et une autre en charge de la spécificité de substrat, et nommée « poche acyle », dans le cas de l'AChE.

Toutes les enzymes de cette famille présentent une triade catalytique, impliquant une sérine, une histidine et un acide aspartique ou glutamique qui, quant à lui, sera toujours trouvé dans une poche inaccessible au solvant. Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases (Schéma 2), conservé, est le suivant :

A/ Après fixation du substrat dans le site actif, la sérine catalytique, nucléophile, attaque son groupement carbonyle et forme un complexe nommé *intermédiaire tétraédrique*. Les études cristallographiques sur plusieurs sérines hydrolases montrent que la sérine catalytique est toujours positionnée idéalement dans le site actif, en vue de permettre cette attaque nucléophile (Frey *et al.*, 1994 ; Wilmoth *et al.*, 1997 ; Dodson & Wlodawer, 1998). Le noyau imidazole de l'histidine catalytique, en constante liaison hydrogène avec l'hydroxyle de la sérine catalytique, prend en charge le proton libéré par cette dernière et forme ainsi un ion imidazolium (catalyse basique générale). La protonation de l'histidine catalytique sera maintenue jusqu'à la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique ; dans le cas de l' α -chymotrypsine, par exemple, il a été estimé le pK_a de son histidine catalytique passe d'une valeur usuelle de 6.5 à 10, lors de la formation de cet intermédiaire (Liang & Abeles, 1987). L'arrachement du proton de la sérine catalytique par l'histidine homonyme est favorisé par la polarisation induite par le troisième partenaire, désolvaté, de la triade catalytique, *i.e.* un acide aspartique ou glutamique, qui reste également en constante liaison hydrogène avec ladite histidine. L'intermédiaire tétraédrique a une existence bien définie, quoique transitoire, et a pu être observé cristallographiquement grâce à l'utilisation d'analogues de substrat, tant sur

l'AChE (Harel *et al.*, 1996) que sur d'autres membres de la famille des sérines hydrolases, par exemple l'élastase (Ding *et al.*, 1994).

B/ L'intermédiaire tétraédrique se décompose rapidement en un intermédiaire « enzyme acylée » et un groupement partant. Dans le cas de l'AChE, c'est la portion choline (Ch) du substrat ACh qui est libérée après acylation de la sérine catalytique. La force d'entraînement qui mène à la formation de cet intermédiaire est le don d'un proton, par l'histidine catalytique, au groupement partant, *i.e.* à la Ch.

C/ L'intermédiaire « enzyme acylée » est enfin dégradé *via* un processus inverse à celui qui à mené à sa formation ; cette fois-ci, c'est une molécule d'eau, nucléophile, qui attaquera la sérine catalytique, permettant par ailleurs la reprotonation de l'histidine homonyme. Cet événement sera suivi par la libération du produit acétate, dans le cas de l'AChE, ou d'un autre carboxylate, dans le cas plus général des sérines hydrolases.

Si nous avons pu décrire assez rapidement le mécanisme catalytique général des sérines hydrolases, quelques lignes de plus seront nécessaires, et certainement utiles, en vue d'établir la grande complexité du mécanisme catalytique particulier de l'AChE.

Loin de suivre une cinétique de type « Michaelis-Menten », l'AChE sera tour à tour activée puis inhibée par son propre substrat, l'ACh, selon qu'elle soit mise en présence de faibles ou d'importantes concentrations en celui-ci, respectivement (Marcel *et al.*, 1998 ; Johnson *et al.*, 2003). L'activation par le substrat fut initialement observée, puis caractérisée, sur une enzyme structuralement homologue à l'AChE (Nicolet *et al.*, 2003), la butyrylcholinestérase (BChE – Eriksson & Augustinsson, 1979). L'inhibition par le substrat, quant à elle, fut observée pour la première fois sur l'AChE (Alles & Hawes, 1940). Jusqu'il y a peu, d'ailleurs, cette

différence de comportement cinétique était utilisée, de pair avec leurs spécificités de substrats respectives, pour distinguer les deux enzymes. Cependant, il a été montré que selon les conditions expérimentales et les substrats utilisés, l'AChE et la BChE pouvaient toutes deux être activées et inhibées par leurs substrats, à basse et haute concentrations en ces derniers, respectivement (Masson *et al.*, 1996 ; Marcel *et al.*, 1998 ; Johnson *et al.*, 2003).

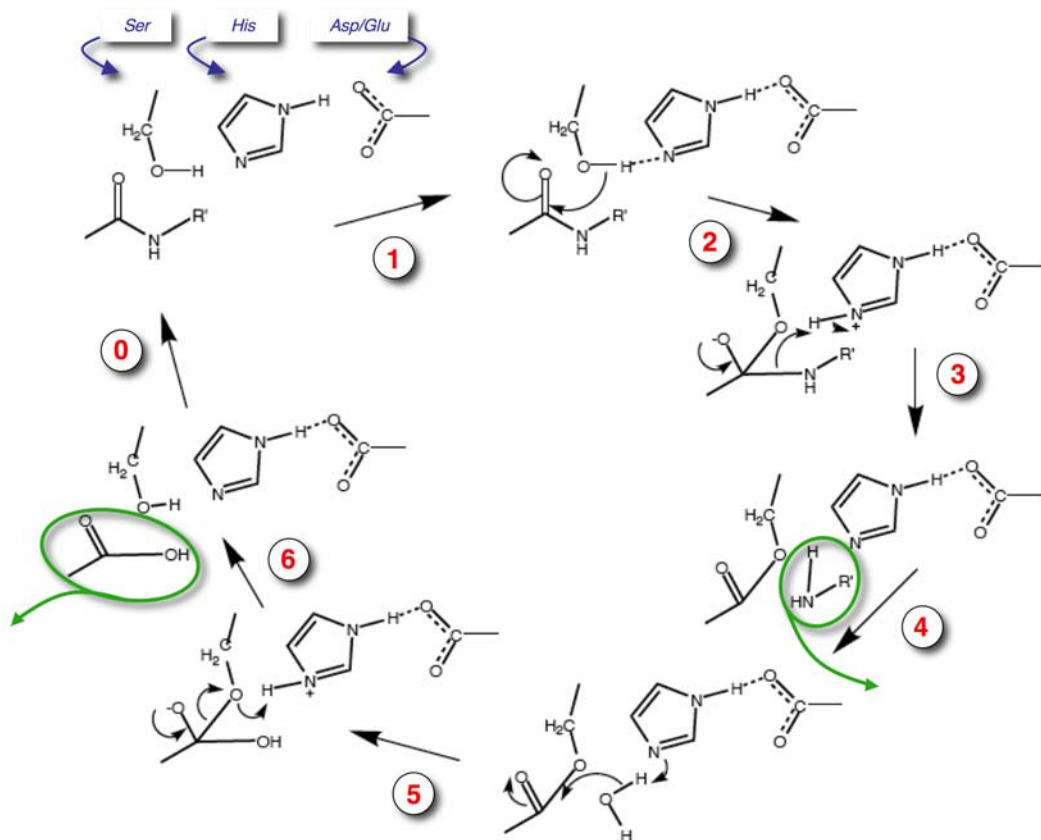


Schéma général d'hydrolyse par une sérine hydrolase (ici nous représentons le cas, typique, de l'hydrolyse d'une liaison peptidique par la trypsine ou la chymotrypsine). On peut considérer les étapes suivantes : (0) Formation du complexe michaëlien ; (1) Attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le substrat ; (2) Formation du 1^{er} intermédiaire tétraédrique ; (3) Libération du 1^{er} produit ; (4) Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la sérine acylée ; (5) Formation du 2^{ème} intermédiaire tétraédrique ; (6) Libération du 2^{ème} produit.

Plusieurs modèles cinétiques ont été proposés, depuis les années 60, afin d'expliquer le comportement cinétique de l'AChE. Tous s'accordent sur l'existence d'au moins deux sites de fixation pour le substrat, le site actif, où la catalyse a lieu, et le site périphérique, où est pré-positionné le substrat avant sa glissade en direction du premier. La fixation de ligands sur le site périphérique change le profil cinétique de l'enzyme (Bergmann *et al.*, 1950 ; Changeux, 1966 ; Belleau *et al.*, 1970 ; Roufogalis & Quist, 1972 ; Taylor & Lappi, 1975) et, de fait, il a été proposé que ce site puisse jouer un rôle actif durant la catalyse. De récentes expériences ont montré son implication dans le phénomène d'activation par le substrat, à basses concentrations (Brochier *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2003). L'ACh, en se fixant au site périphérique d'une enzyme contenant déjà un substrat en son site actif, va induire une accélération de l'étape de déacylation. Cette dernière étant l'étape limitante de la réaction, la répercussion de son accélération sur le temps global de catalyse est profitable.

Concernant le phénomène d'inhibition de l'AChE par son substrat, à hautes concentrations, une controverse subsiste quant au degré d'implication du site périphérique. Il avait été postulé, très précocement (Krupka & Laidler, 1961), que l'inhibition de l'AChE par son substrat soit due à un ralentissement de l'étape de déacylation, induit par la fixation d'une molécule de substrat au site actif de l'enzyme acylée. Un autre modèle cinétique, plus intuitif, a par la suite été proposé par le groupe de T. Rosenberry (Szegletes *et al.*, 1998 ; Rosenberry *et al.*, 1999). Suivant ce modèle, ce serait le blocage de la sortie du produit Ch, par une molécule de substrat liée au site périphérique, qui endosserait la responsabilité de l'inhibition de l'AChE par son substrat. Un nouveau modèle a récemment été proposé (Stojan *et al.*, 2004), d'après lequel l'inhibition par le substrat serait un phénomène à deux étapes. A moyennement haute concentration de substrat, l'inhibition de la sortie du produit Ch, par une molécule de substrat liée au site périphérique de l'enzyme, serait responsable d'un

ralentissement de la catalyse. L'inhibition « totale », quant à elle, ne serait atteinte qu'à des concentrations bien plus élevées de substrat, et résulterait, le cas échéant, d'une inhibition de la déacylation suite à la fixation de deux molécules de substrat dans la gorge de l'enzyme acylée.

Parallèlement à cette dispute sur la succession d'événements menant aux phénomènes d'activation et d'inhibition par le substrat, une autre controverse bat son plein sur le comportement dynamique de l'AChE. Etant donné l'enfouissement du site actif il reste, d'un point de vue purement mécanistique, difficile à concevoir que 1000 à 20000 molécules de substrat et de produits puissent, à chaque seconde, entrer et sortir du sein de l'enzyme, respectivement. Qui plus est, le diamètre accessible de la gorge est, à mi-hauteur, de seulement 3 Å (étant considérées les sphères de van der Waals des résidus impliqués dans la mise en place de ce rétrécissement) dans la structure de l'enzyme native : seule une molécule d'eau pourrait donc théoriquement accéder à son site actif. Sachant qu'un ion TMA isolé correspond à une sphère de van der Waals d'un diamètre de 6.4 Å, il apparaît évident qu'une flexibilité conformationnelle de la gorge sera requise afin de permettre l'entrée du substrat, la survenue de la catalyse puis la sortie des produits.

Dans ce contexte, l'existence d'une porte de sortie « annexe » pour le produit Ch a été proposée. Cette porte de sortie annexe, ou « back-door », invisible dans la structure statique aux rayons X, s'ouvrirait juste derrière le sous-site anionique du site actif où est stabilisée la choline, *i.e.* au niveau du Trp84. Si plusieurs simulations de dynamique moléculaire ont conforté cette hypothèse (Gilson *et al.*, 1994 ; Axelsen *et al.*, 1994 ; Tai *et al.*, 2001 ; Tai *et al.*, 2002), aucune preuve expérimentale directe, la confirmant ou l'infirant, n'a été à ce jour apportée. Aucune des campagnes de mutagenèse dirigée, menées en vue d'adresser

l'existence de cette back-door, n'en a soutenu la nécessité pour rendre compte de la catalyse enzymatique (Kronman *et al.*, 1994 ; Velan *et al.*, 1996 ; Faerman *et al.*, 1996). Pourtant plusieurs rapports font état d'une activité résiduelle de l'AChE en présence la fasciculine (Marchot *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1995), un peptide qui bloque complètement l'entrée de la gorge et donc l'accès au site actif (Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Kryger *et al.*, 2000). La fasciculine est un inhibiteur de type « slow-binding » qui, ensuite de sa fixation, ne se décrochera pratiquement plus ($k_{on}/k_{off} > 10^{15}$). Aussi l'observation d'une activité résiduelle de l'AChE en présence de ce peptide est-elle une indication forte concernant l'existence d'entrées et/ou de sorties alternatives pour le substrat et/ou le produit Ch. Par ailleurs, la structure du complexe de la TcAChE avec un carbamate dérivé de la phytosgimine a montré que son groupement partant pouvait quitter le site actif même en présence d'une chaîne alkyle de 8 carbones liée en travers la gorge (Bartolucci *et al.*, 1999) ; cette observation implique indirectement qu'une autre « porte de sortie » que la gorge s'est ouverte pour laisser sortir ledit groupement.

Concernant le second produit de la catalyse, *i.e.* l'acétate, il a aussi été proposé qu'il puisse quitter le site actif sans repasser par la gorge grâce à l'ouverture, ultra-rapide, d'un chemin de sortie au travers de la poche acyle (Kovach *et al.*, 1994). La mise en place de cette nouvelle porte de sortie réclamerait des mouvements substantiels de la boucle 279-290, qui participe à la mise en place du site périphérique et de la poche acyle. Il faut noter que cette boucle peut être très mobile, en présence de certains inhibiteurs (la galanthamine, par exemple – Greenblatt *et al.*, 2004), ce qui pourrait autoriser sa putative implication dans un tel mécanisme.

II-4 – Implication de l'AChE dans la maladie d'Alzheimer

La cause la plus fréquente de démence sénile est probablement, de nos jours, la maladie d'Alzheimer (MA : Maladie d'Alzheimer). C'est une maladie chronique qui s'établit progressivement et entraîne, au fur et à mesure, une perte des fonctions cognitives (la mémoire, le jugement, l'orientation, la compréhension, la capacité d'apprendre et le langage). On compte actuellement, en France, 800000 cas, et il en apparaît \approx 100000 nouveaux par an. Il est donc aisément prédictible qu'à terme, la MA ne sera plus seulement un problème de santé publique mais également un problème de société majeur, étant considérés les coûts humains et sociaux d'une telle maladie. Il faut comprendre que les personnes atteintes par cette affection ont besoin, en *sus* d'une médication appropriée, d'une quasi-constante assistance. Ainsi on estime qu'un malade d'Alzheimer coûte aujourd'hui entre 30000 et 40000 euros par an à la société, dont la moitié, au moins, est imputée sur le budget de sa famille proche.

La perte de fonctions cognitives, observée dans tous les types de démence, est liée à une efficacité décriée des processus de neurotransmissions et à la dégénérescence des circuits neuronaux du cerveau (Poirier, 2002). Ceci rend d'ailleurs parfois le diagnostic d'une démence assez compliqué, car plusieurs types de démences se partagent les mêmes symptômes cliniques. Chez les individus atteints de MA, on observe une perte progressive du réseau de neurones cholinergiques et, conséquemment, une diminution assez forte du taux d'ACh dans le cerveau ; cet effet sera particulièrement substantiel au niveau des néo-cortex pariétaux et temporaux, ainsi qu'au niveau de l'hippocampe (Davies *et al.*, 1976 ; Whitehouse *et al.*, 1982). Ce déficit cholinergique sera également observé dans le cas de démences vasculaires (VD : Vascular Dementia) ou associées à des corps de Lewy (LBD : Lewy Bodies

Dementia), ce qui semble suggérer que les patients atteints de ces différentes maladies dégénératives puissent bénéficier du même traitement symptomatique (Gottfries *et al.*, 1994 ; Tohgi *et al.*, 1996 ; Tiraboschi *et al.*, 2000 ; McKeith *et al.*, 2003). Il faut noter d'ailleurs que ces maladies sont souvent associées les unes aux autres : 25% des individus atteints de la MA révèlent, après autopsie, une démence vasculaire (VD), tandis que 20% des individus atteints de démence, en général, présentent après autopsie, une MA associée à une LBD (Hansen & Crain, 1995 ; Gorelick *et al.*, 1996 ; Tiraboschi *et al.*, 2000).

Comme nous l'avons déjà énoncé plusieurs fois, l'ACh est hydrolysée, dans le tissu cérébral, par l'AChE, mais aussi par la BChE, quoique dans une proportion bien plus faible. Bien que l'AChE se retrouve à des concentrations beaucoup plus élevées que la BChE, chez l'individu sain ou malade de MA, cette dernière sera néanmoins présente et active dans toutes les régions hippocampiques et corticales présentant une innervation cholinergique (Mesulam *et al.*, 2002). Des études ont montrés, depuis maintenant presque 30 ans, qu'au fur et à mesure que la MA progresse, l'activité de l'AChE diminue jusqu'à 67 % de son activité initiale, tandis qu'inversement, celle de la BChE augmente jusqu'à 165 % de son activité initiale (Perry *et al.*, 1978a ; Perry *et al.*, 1978b). Ainsi, même si l'AChE reste l'enzyme principalement responsable de la terminaison des influx nerveux cholinergiques, on observera, au cours du développement de la MA, une implication de plus en plus significative de la BChE dans la co-régulation des niveaux d'ACh cérébraux. De fait, il a été proposé, récemment, de traiter cette affection par des molécules inhibant à la fois l'AChE et la BChE (Ballard, 2002 ; Greig *et al.*, 2002 ; Giacobini *et al.*, 2002). Un programme du département américain pour la santé des personnes âgées (US Dept. of Health and Human Service's National Institute on Aging – www.alzheimers.org) a de fait été initié en vue de développer

des inhibiteurs spécifiques de la BChE (Greig *et al.*, 2001 ; Greig *et al.*, 2002 ; Ballard, 2002).

L'inhibition réversible et partielle de l'AChE et/ou de la BChE va entraîner une augmentation de la concentration en ACh dans les synapses du système nerveux central et, conséquemment, une amélioration de la fonction cholinergique. Bien que plusieurs autres approches thérapeutiques aient été testées dans l'espoir de résorber le déficit cholinergique et les troubles cognitifs associés à la MA, l'inhibition cholinestérasique reste, à ce jour, la seule stratégie de traitement qui se voit montrée vraiment valable. A ce jour, les trois molécules les plus couramment utilisées dans le traitement de la MA sont donc des inhibiteurs cholinestérasiques, *viz.* le « donézépil » (donézépil hydrochloride), la « galantamine » (galantamine hydrobromide) et la « rivastigmine » (rivastigmine tartrate). Ces molécules ont un effet bénéfique à la fois sur la fonction cholinergique globale, mais aussi sur les fonctions cognitives, et sont, à posologie appropriée, pharmacologiquement bien tolérées par les patients. Il faut noter que dans le cas de la MA, une non-évolution de la maladie est, en soi, une amélioration notable ; les fonctions cognitives perdues par le patient n'ont en effet aucune chance d'être, un jour, retrouvées. Pour cette raison, le traitement anticholinestérasique doit être initié et suivi dès l'apparition des premiers symptômes si l'on veut ralentir au maximum la prise de la maladie.

Le donézépil et la galantamine inhiberont sélectivement et assez rapidement l'AChE. L'utilisation de ces molécules entraîne généralement, et pendant une période pouvant aller jusqu'à 6 mois, une surproduction d'AChE dans le fluide cérébrospinal, qui pourra, dans certains cas, diminuer leur efficacité (Davidsson *et al.*, 2001 ; Poirier, 2002). Il faut noter que la galantamine, qui est un alcaloïde, a un mécanisme d'action double en vue de restaurer la

fonction cholinergique. Etant un régulateur allostérique du récepteur nicotinique, elle va, ensuite de sa fixation sur celui-ci, augmenter la probabilité d'ouverture du canal à sodium qui lui est associé (Maelicke *et al.*, 2001), ce qui aura un effet bénéfique supplémentaire sur l'efficacité de la transmission cholinergique. La rivastigmine, quant à elle, est un inhibiteur réversible lent qui pourra inhiber l'AChE et la BChE (Giacobini *et al.*, 2002). L'utilisation de la rivastigmine n'entraînera pas de surproduction cholinestérasique (Darreh-Shori *et al.*, 2002) et semble donc, à tout point de vue, préférable à celle du donépépil ou de la galantamine. Cela étant, selon les patients, les différents traitements seront plus ou moins efficaces ; les cliniciens recommandent donc, quant le traitement avec un de ces anti-cholinestérasiques particulier a échoué, de poursuivre le traitement avec une autre de ces trois molécules, afin de ne pas laisser aux dommages cholinergiques et cognitifs, irréversibles, le temps de se mettre en place (Ellis, 2005). Ces molécules pourront cependant avoir des effets secondaires gênants parmi lesquels les crampes musculaires, l'anorexie, la fatigue, la diarrhée et/ou la nausée.

Au-delà de leurs implications dans la neurotransmission cholinergique, l'AChE, comme la BChE, joueront un rôle « structural » dans le développement de la MA. Cette maladie se caractérise, étiologiquement, par la présence de « plaques amyloïdes » (amyloïde : dont la structure ressemble à celle de l'amidon, *i.e.* réticulé) et enchevêtrements de neurofibrilles. Ces nouvelles structures tissulaires, pathologiques et neurotoxiques, sont la conséquence de la dénervation cholinergique (Braak & Braak, 1996 ; Farlow, 2002), et on trouvera, associées celles-ci, l'AChE et la BChE (Arendt *et al.*, 1992 ; Moran *et al.*, 1993 ; Mesulam & Geula, 1994 ; Inestrosa *et al.*, 1996 ; Guillozet *et al.*, 1997). Les cholinestérases sont retrouvées très précocement dans le développement des plaques amyloïdes (Moran *et al.*, 1993) et des enchevêtrements de neurofibrilles (Mesulam *et al.*, 1992). Les isoformes de l'AChE et de la BChE qui entrent dans la constitution de ces nouvelles structures ne sont pas exprimées par le

tissu neuronal, mais plutôt par la glie (Geula *et al.*, 1994), qui ne le fait, hors ce contexte, qu'au cours du développement embryonnaire. L'AChE va promouvoir l'agrégation des plaques amyloïdes, par un mécanisme impliquant son site périphérique (Inestrosa *et al.*, 1996) ; la BChE, quant à elle, accélèrera la maturation des plaques bénignes en plaques neurotoxiques (Guillozet *et al.*, 1997).

Pour ces diverses raisons, la recherche sur d'éventuels nouveaux traitements pour la MA se focalise actuellement sur la production d'inhibiteurs spécifiques, soit de la BChE, soit de l'AChE. Dans le cas de l'AChE, une attention toute particulière est désormais portée aux doubles inhibiteurs, pouvant se lier à la fois au site actif et au site périphérique : éviter la formation des plaques amyloïdes reviendrait en effet à ralentir la prise de la MA et de la neurodégénérescence qui lui est associée.

Chapitre III :
Cristallographie aux rayons X

III – La cristallographie aux rayons X :

III-1 – Introduction :

La biologie structurale est une direction particulière de la biologie qui vise à élucider la structure des macromolécules biologiques à résolution atomique (*i.e.* à une résolution de l'ordre de $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$), en vue de mieux comprendre les processus du vivant. A ce jour, trois méthodes uniquement permettent d'atteindre ce but en routine :

- La microscopie électronique structurale, dont la résolution est de l'ordre 3 à 20 \AA ; cette méthode sera le plus souvent employée pour résoudre la structure de larges ensembles macromoléculaires, comme le ribosome, les microtubules ou les virus. Cette méthode présente l'avantage, unique, de permettre la reconstruction d'une structure à partir d'une molécule unique ; c'est en effet directement, et dans l'espace réel, que seront observés les objets étudiés (Chiu *et al.*, 2005).

- La résonance magnétique nucléaire ou RMN, qui permet une reconstruction indirecte de la structure grâce à la mesure de distances interatomiques. Cette méthode est limitée, en terme de taille de l'objet étudié, et ne pourra typiquement être utilisée que si ce dernier a un poids moléculaire inférieur à $\approx 30 \text{ KDa}$. Cela étant, le résultat obtenu ne sera pas une structure unique et statique de la molécule étudiée, mais plutôt un ensemble de structures sous sélectionnées par des critères de vraisemblance. En soi, ceci est un avantage puisque cela permet d'obtenir, par la même expérience, une information structurale et dynamique.

- La cristallographie aux rayons X, dont la résolution typique varie entre 0.6 et 4 \AA , et la taille des objets, entre 12 et plusieurs millions de Da (par exemple, le ribosome, dont le poids moléculaire de chaque sous unité excède le MDa). Cette méthode a été utilisée depuis le début du siècle dernier pour déterminer la structure des petites molécules organiques ou

inorganiques ; la Cambridge Crystallographic Database contient aujourd'hui plus de 335000 structures de ce type. Mais c'est Perutz qui, en 1959, publiera la première structure macromoléculaire résolue par cristallographie aux rayons X, *viz.* celle de la myoglobine. Depuis, la cristallographie macromoléculaire a fait beaucoup de chemin, tant du point de vue méthodologique et instrumental, que de celui des applications. A ce jour, c'est la technique la plus prolifique en biologie structurale : parmi les plus de 30000 structures macromoléculaires déposées dans la Protein Data Bank (PDB), 90 % ont été résolues grâce à la cristallographie aux rayons X.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la radiocristallographie comme principale méthode d'analyse. Nous allons donc décrire, dans les lignes qui suivent, les bases théoriques de la cristallographie monochromatique, puis les différentes exigences pratiques de la résolution d'une structure par cette méthode. Nous présenterons ensuite brièvement la « cristallographie cinétique », *i.e.* l'ensemble des méthodes et astuces qui visent à caractériser, structuralement, des états intermédiaires de réaction dans les cristaux de protéines.

III-2 – Bases théoriques de la cristallographie monochromatique des protéines :

Nous allons décrire, dans cette section, quelques-uns des aspects théoriques sous-jacents à la radiocristallographie monochromatique des protéines. Nous nous limiterons aux principes fondamentaux nécessaires pour une compréhension globale ; plus de détails peuvent être trouvés dans les « textbooks » de cristallographie (Drenth, 1999 ou McPherson, 2003, par exemple).

III-2.1 : Loi de Bragg

Dans une expérience de diffraction monochromatique, le cristal est placé sur le trajet d'un faisceau de RX de longueur d'onde bien définie. Sur une source de laboratoire (générateur à anode tournante – voir plus loin), la longueur d'onde est imposée par le matériau utilisé pour générer le rayonnement (dans le cas d'une anode tournante en cuivre, cette longueur d'onde caractéristique sera 1.54 Å). Dans un synchrotron (voir plus loin), le spectre du rayonnement sera beaucoup plus large, et l'utilisateur pourra choisir sa longueur d'onde de travail grâce à un monochromateur. Les atomes constitutifs d'un cristal peuvent être considérés comme appartenant à différents plans de celui-ci. La réflexion des RX par les plans imaginaires d'un cristal se produira dans quelques directions, discrètes, quand les interférences entre les ondes diffusées par les électrons des différents atomes qui le composent seront constructives. Ces interférences ne se seront constructives que si les ondes réfléchies par tous les plans parallèles du cristal sont en phase. On exprime cette condition de diffraction par la loi de Bragg (Equation 1) :

$$2.d.\sin \theta = n.\lambda \quad \text{(Equation 1)}$$

où d correspond à l'espacement entre deux plans parallèles, θ à l'angle de réflexion des RX sur ces plans, n à n'importe quel nombre entier et λ à la longueur d'onde.

Le concept de diffraction peut être visualisé comme la réflexion, par un ensemble de plans parallèles du cristal, d'un faisceau de rayons X parallèles (Figure 6). L'angle θ , entre la direction du faisceau incident et ces plans, est égal à l'angle entre la direction du faisceau réfléchi et ces mêmes plans.

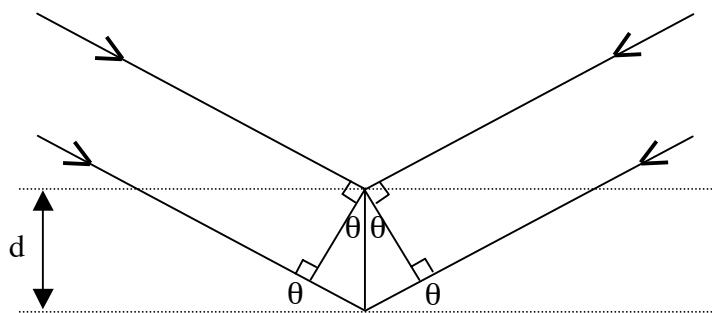


Figure 6 : Représentation schématique de la loi de Bragg et du concept de diffraction.

La « différence de marche » (ou différence de chemin parcouru) entre les deux faisceaux de RX parallèles de la Figure 6 est égale à « $2.d.\sin \theta$ ». Pour pouvoir donner lieu à une interférence constructive, et ainsi permettre le phénomène de diffraction, la différence de marche entre deux faisceaux de RX parallèles (*i.e.* réfléchis par des plans parallèles du cristal) devra être le produit de la longueur d'onde par un nombre entier, *i.e.* « $n.\lambda$ ».

Les taches observées sur un cliché de diffraction (Figure 7) correspondent aux intersections entre les faisceaux de RX réfléchis et le détecteur. La direction d'un faisceau réfléchi, et sa position sur le cliché, sont déterminés par l'orientation des plans imaginaires à l'intérieur du cristal et par la longueur d'onde du faisceau incident. L'intensité des réflexions est fonction de la distribution des atomes dans la maille ; de fait, le cliché de diffraction renseigne, bien qu'indirectement, sur la position des différents atomes dans la maille.

Pour chaque orientation fixe du cristal dans le faisceau de RX, seules quelques réflexions seront observées sur le cliché, dont le nombre dépendra de la taille de la maille, de la longueur d'onde et de la distance cristal – détecteur. Si le cristal subit une oscillation durant l'exposition, plus de plans imaginaires seront autorisés à réfléchir les RX ; le cliché obtenu contiendra plus de taches de diffraction, et donc plus d'informations. Les cristaux étant

toujours imparfaits, *a fortiori* ceux de protéines, il y aura, à longue distance, un désalignement des micro-blocs cristallins les uns par rapport aux autres, et ce, dans toutes les directions de l'espace : on parle du caractère « mosaïque » d'un cristal, ou de sa « mosaïcité » (Figure 8). Le désalignement, même léger, des plans imaginaires du cristal aura, pour conséquence un élargissement des taches de diffraction, chacune étant, dès lors, le fruit de la réflexion du faisceau de RX incident par une somme de plans quasiment parallèles. Si un tel cristal est exposé dans une orientation fixe, toutes les réflexions ne seront mesurées que partiellement. S'il est oscillé néanmoins, il sera possible d'enregistrer l'intensité totale de la majorité des réflexions (étant entendu que la mozaïcité du cristal est inférieur à l'angle de d'oscillation), et les intensités correspondant à des observations partielles seront sommées sur deux clichés consécutifs.

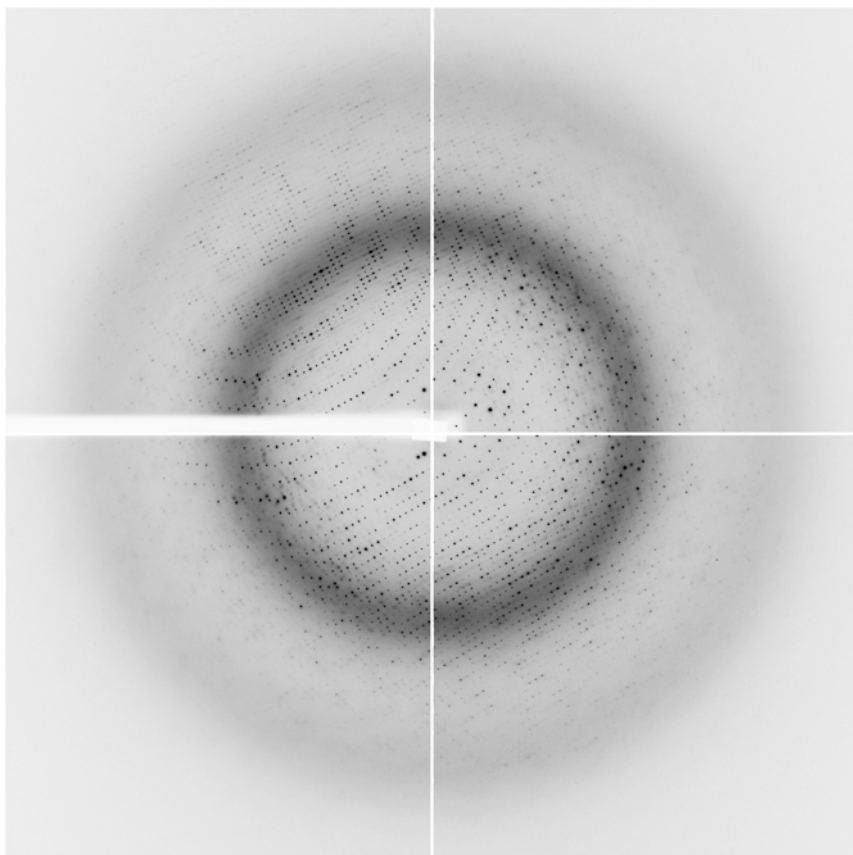


Figure 8 : Cliché de diffraction collecté sur un cristal natif trigonal de TcAChE. La trace blanche, au centre, correspond à l'ombre du « beam-stop », qui protège le détecteur du faisceau direct de rayons X incident.

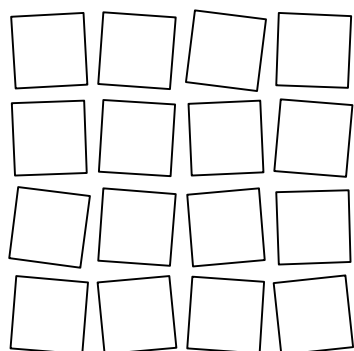


Figure 8 : Illustration de la mosaïcité d'un cristal. Plusieurs microbloques cristallins, ordonnés à courte distance, sont désalignés les uns par rapport aux autres et faussent de fait l'ordre à longue distance du cristal.

III-2.2 : Sphère d'Ewald et réseau réciproque :

La cristallographie aux rayons X est une méthode tridimensionnelle, égard tant à l'échantillon qui permet la mesure, *i.e.* le cristal, qu'au résultat final obtenu en suite de l'expérience, *i.e.* la structure. Pour obtenir la seconde à partir du premier, il faudra se représenter l'expérience dans un nouvel espace, l'espace réciproque, qui seul pourra permettre, *in fine*, l'interprétation du cliché de diffraction. Le réseau réciproque est une construction mathématique, basée sur le réseau réel du cristal, et dont les longueurs de vecteurs sont inversées par rapport à ce dernier. Dans le cas le plus élémentaire, *i.e.* si les angles α , β et γ de la maille cristalline sont égaux à 90° , les vecteurs \mathbf{a} , \mathbf{b} et \mathbf{c} , déterminant les dimensions de cette maille, sont liés aux vecteurs \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* et \mathbf{c}^* , déterminant celles de la maille du réseau réciproque, par une relation d'inversion simple : $\mathbf{a}^* = 1/\mathbf{a}$; $\mathbf{b}^* = 1/\mathbf{b}$; $\mathbf{c}^* = 1/\mathbf{c}$. Le réseau direct, à l'intérieur du cristal, peut donc être transformé en un réseau réciproque, à l'extérieur du cristal ; à chaque nœud du réseau réciproque correspond un plan particulier du réseau direct. La dimension d'un vecteur du réseau réciproque est égale à la valeur réciproque de l'espacement entre deux plans parallèles dudit réseau, *i.e.* $1/d_{hkl}$, soit h , k et l les indices de ce plan. Le centre du cristal est le centre du

réseau réciproque ; plus la résolution d'une réflexion sera élevée (*i.e.* plus ses indices h , k , et l seront important), et plus celle-ci sera éloignée du centre du réseau.

La construction d'Ewald est une représentation schématique et pratique de la diffraction des rayons X par un cristal (Figure 9). Soit un faisceau incident de RX parallèles et de longueur d'onde λ : ceux-ci seront représentés, dans l'espace réciproque, par une sphère de rayon $1/\lambda$, dont le centre sera aligné sur l'axe des rayons X incident (et donc à une distance de $1/\lambda$ du centre du cristal). La résolution maximale d'un cristal pourra également être assimilée une sphère, de rayon $1/d_{\min}$ – soit d_{\min} le plus petit espacement possible entre deux plans du réseau réciproque – dont le centre sera confondu avec celui du cristal. Suivant cette représentation schématique (Figure 9), la diffraction des RX ne pourra avoir lieu que lorsqu'un nœud du réseau réciproque, contenu dans la sphère de résolution (de rayon $1/d_{\min}$), entrera en contact avec la sphère d'Ewald (de rayon $1/\lambda$). Soit une réflexion d'indices h , k , et l , on peut définir un vecteur de diffusion, d'angle 2θ par rapport au faisceau de RX incident, qui joint le centre de la sphère d'Ewald et le nœud du réseau réciproque d'indices h , k , et l . En translatant l'origine de ce vecteur vers le centre du réseau réciproque, *i.e.* le centre de la sphère de résolution, on peut déterminer, étant donnée la distance cristal – détecteur, le point d'impact des rayons X – réfléchis par le plan d'indice h , k , et l du cristal – sur le détecteur.

Chaque nœud du réseau réciproque est désigné par trois indices, h , k , et l , et correspond à un plan de réflexion particulier du cristal. Le réseau réciproque a pour origine le centre du cristal ($h=0$, $k=0$, $l=0$) et est, intrinsèquement, centrosymétrique. De fait, les réflexions d'indices h , k , l , ont la même intensité que celles d'indices $-h$, $-k$, $-l$; cette propriété du réseau réciproque découle de sa centrosymétrie et est énoncée par la loi de Friedel. Néanmoins, si le cristal est sujet au phénomène de diffusion anormale, *i.e.* si des diffuseurs anormaux ont été introduits

dans la protéine par trempage ou co-cristallisation, alors le réseau réciproque n'est plus centrosymétrique et les réflexions d'indices h, k, l , n'ont plus la même intensité que celle d'indices $-h, -k, -l$. C'est donc la limite de validité de loi de Friedel qui sera, en cas de diffusion anormale, abandonnée au profit de celle de Bijvoët.

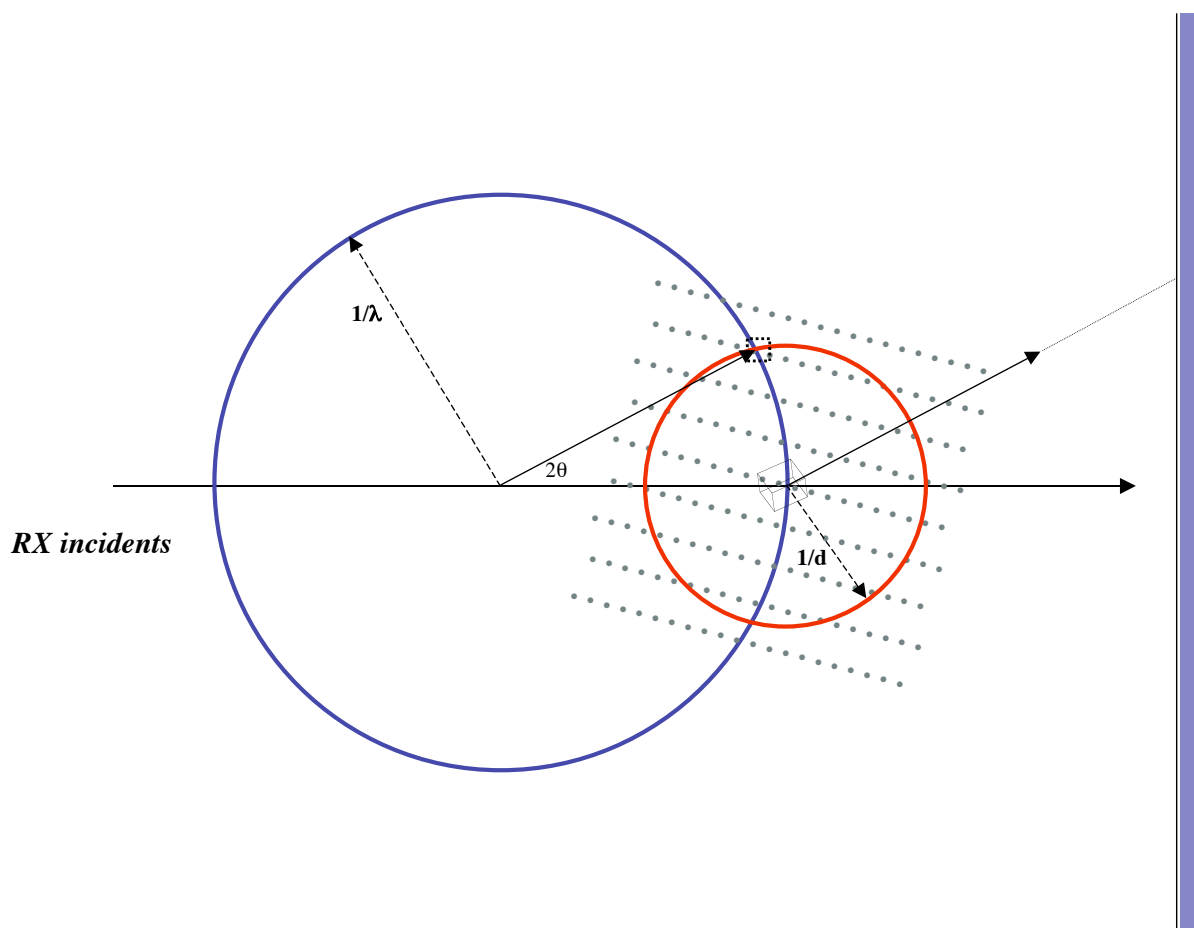


Figure 9 : Construction d'Ewald pour une expérience monochromatique. Les nœuds du réseau réciproque contenus dans la sphère de résolution (de rayon $1/d$) donneront lieu au phénomène de diffraction lorsqu'ils entreront en contact avec la sphère d'Ewald (de rayon $1/\lambda$). Le vecteur de diffusion, qui joint le centre du cristal et le nœud d'indices h, k , et l , permet de prédire le point d'impact des RX réfléchis sur le détecteur.

III-2.3 : La transformée de Fourier :

La finalité de l'expérience de cristallographie aux rayons X est de résoudre la structure tridimensionnelle du composé cristallisé, grâce à l'interprétation de ses clichés de diffraction.

La relation mathématique qui lie la structure, dans l'espace réel, au cliché de diffraction, dans l'espace réciproque, est la Transformée de Fourier (TF). Les atomes constitutifs de la maille élémentaire d'un cristal occupent des positions fixes les uns par rapport aux autres, et ces positions relatives seront conservées, au sein du cristal entier, par l'application de la symétrie cristallographique. Ainsi, soit V le volume de la maille élémentaire, chaque facteur de structure, F_{hkl} , est une fonction de la distribution de densité électronique, $\rho(x,y,z)$, à chaque point (x, y, z) de l'espace réel (Equation 2) :

$$F_{hkl} = V \cdot \int_h \int_k \int_l \rho(x,y,z) \cdot e^{2\pi i \cdot (hx + ky + lz)} dx dy dz \quad (\text{Equation 2})$$

Pour la réflexion d'indices h, k, l , la valeur absolue du facteur de structure F_{hkl} est directement proportionnelle à la racine carrée de l'intensité mesurée I_{hkl} . Si on applique la transformée de Fourier inverse, la distribution de densité électronique au sein d'un cristal peut être exprimée comme une fonction des facteurs de structure (Equation 3) :

$$\rho(x,y,z) = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \cdot e^{2\pi i \cdot (hx + ky + lz)} \quad (\text{Equation 3})$$

Cette relation (Equation 3) est exprimée sous la forme d'une triple sommation plutôt que sous celle d'une triple intégrale, car les indices h, k et l ne peuvent avoir que quelques valeurs discrètes, entières et bien définies. Le facteur de structure F_{hkl} est un nombre complexe ; à chaque réflexion correspond donc une intensité et une phase. Si on applique la relation d'Euler pour exprimer le nombre complexe F_{hkl} en terme de sinus et de cosinus, et si on considère que la loi Friedel est respectée, l'équation 3 devient l'équation 4 :

$$\rho(x,y,z) = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cdot \cos 2\pi.(hx + ky + lz - \alpha_{hkl}) \quad (\text{Equation 4})$$

soit α_{hkl} la phase de la réflexion d'indices h , k et l .

L'information de phase ne peut pas être obtenue lors de l'expérience de cristallographie aux rayons X ; de fait, l'interprétation d'un cliché de diffraction ne sera jamais vraiment triviale. Différentes méthodes pourront être appliquées en vue de résoudre ce problème de phase, dont une brève description est donnée dans la section III-3.6.

III-3 – Aspects pratiques de la cristallographie aux rayons X :

Un pré-requis évident, dans le contexte d'une analyse cristallographique, est la disponibilité de cristaux de la molécule d'intérêt. La cristallisation d'une molécule est un cas particulier de sa précipitation. En effet, une molécule dans une solution saturée, voire sursaturée, a rapidement tendance à précipiter sous la forme d'un agrégat désordonné. Si l'on veut organiser régulièrement et répétitivement les différentes molécules dans un cristal, il faudra contrôler, très précisément, la cinétique de précipitation de la molécule, ce qui dépendra de la nature et de la concentration de l'agent précipitant utilisé, de la nature du solvant et de ses propriétés tampons, du pH de la solution de cristallisation, de la température, de la présence d'additifs, *etc* ... Le processus de cristallisation d'une molécule est donc un phénomène complexe, sur lequel l'expérimentateur n'a que peu de prise et, mis à part une exhortation à tester un maximum de conditions, nul ne saurait donner un conseil univoque en la matière. La solution à partir de laquelle une molécule cristallise est nommée, le cas échéant, sa « liqueur mère » ; il y aura, dans certains cas, une composition unique de liqueur mère permettant à la cristallisation d'avoir lieu (Drenth, 1999 ; McPherson, 2003).

Un cristal consiste en la répétition, le long de ses trois dimensions, d'un motif donné que l'on nomme la « maille élémentaire ». Une maille pourra contenir une copie unique de la molécule d'intérêt ou plusieurs, selon le cristal considéré. Dans la plupart des cas, quand plusieurs molécules sont présentes dans la maille, elles sont liées les unes aux autres par des opérateurs de symétrie cristallographique. La plus petite portion de la maille, contenant toute l'information nécessaire pour reconstruire la totalité du cristal en utilisant les opérateurs de symétrie cristallographique et les translations, est nommée l'unité asymétrique. Cette unité asymétrique pourra, dans certains cas, contenir plusieurs copies de la molécule d'intérêt, lesquelles seront, parfois, liées par des opérateurs de symétrie non-cristallographique.

Un cristal de protéines, utile pour une expérience de diffraction aux rayons X, a généralement une taille d'arête de l'ordre de 0.1 à 0.5 mm ; idéalement, il est isotrope, *i.e.* que ses dimensions sont identiques le long des trois axes du cristal. Les interactions inter-protéines, responsables de l'empilement cristallin à courte comme à longue distance, n'impliquent, le plus souvent, que des petites portions de la surface de la protéine. De fait, il se forme des canaux parfois très larges entre les différentes protéines du cristal ; on les nomme canaux de solvants, et ils représenteront, dans la plupart des cas, 20 à 80 % du volume total du cristal. L'empilement des molécules dans un cristal sera rarement parfait à courte, à moyenne et à longue distance : on parle de la mozaïcité du cristal ; plus un cristal sera mozaïque, plus la qualité des clichés de diffraction sera mauvaise (voir III-2).

III-3.1 : Cristallisation d'une protéine :

Ainsi que nous l'avons déjà introduit, la cristallisation d'une protéine est un cas particulier de sa précipitation, laquelle survient, généralement, quand cette protéine n'est plus soluble. La solubilité d'une macromolécule est fonction de nombreux paramètres : sa concentration, la concentration en agents précipitants, la concentration en additifs, la concentration de l'espèce tampon, le pH, la température, la force ionique, *etc*, ... La cristallisation d'une protéine est donc un compromis très fin entre les différents facteurs thermodynamiques déterminant sa solubilité, et elle ne surviendra que lorsque aura été atteint l'état de sursaturation, favorable à la nucléation et à la croissance cristalline. Chaque protéine cristallisera dans des conditions particulières, parfois uniques, et le processus de cristallogenèse pourra donc prendre beaucoup de temps. Il s'appuiera, le plus souvent, sur un criblage de conditions de cristallisation ayant déjà permis de cristalliser d'autres protéines et, dans le cas le plus favorable, sur les conditions de cristallisation d'une protéine homologue.

La technique de cristallisation la plus usitée de nos jours est basée sur le contrôle de la diffusion de vapeur (McPherson, 1976). Dans une expérience de cristallisation en « goutte suspendue », la protéine, en solution aqueuse, est introduite dans une solution contenant les éléments susceptibles de la faire précipiter, *i.e.* l' (ou les) agent(s) précipitant(s), le (ou les) tampon(s) et, le cas échéant, le (ou les) additif(s) approprié(s). La goutte, d'un volume typique de 1 à 5 μl , est ensuite disposée hermétiquement en regard d'un puits, d'un volume type de 500 à 1500 μl . L'équilibre s'établit entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles jusqu'à ce que la tension de vapeur soit la même dans la goutte et dans le réservoir (Figure 10). Dans la plupart des cas, la goutte est plus diluée que le réservoir en agents précipitants, ce qui entraîne une concentration de la goutte par diffusion de vapeur vers le

réservoir. La protéine, qui n'est pas volatile et ne diffusera donc pas, reste dans la goutte au sein de laquelle elle sera petit à petit concentrée. L'état de sursaturation s'établit donc progressivement, en augmentant simultanément la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, ce qui peut conduire à l'obtention de cristaux.

Un agent précipitant est un composé qui, à partir d'une concentration donnée, poussera la protéine à précipiter hors de la solution dans laquelle elle était jusqu'alors solubilisée, et ce, de façon plus ou moins ordonnée. Différents types de molécules pourront servir d'agents précipitants : des sels (par exemple, le sulfate d'ammonium), des solvants organiques (par exemple, l'isopropanol) ou des polymères (par exemple, le poly-éthylène-glycol). Il faudra également que soit présente une espèce tampon, afin de maintenir le pH, et parfois des additifs, par exemple des détergents, des sels de métaux lourds ou des acides aminés. Pour optimiser la croissance cristalline, il faudra souvent jouer sur la vitesse d'agrégation des protéines en ajustant, par exemple, la concentration de l'agent précipitant, le volume du réservoir et/ou la température de cristallisation (Drenth, 1999 ; McPherson, 2003).

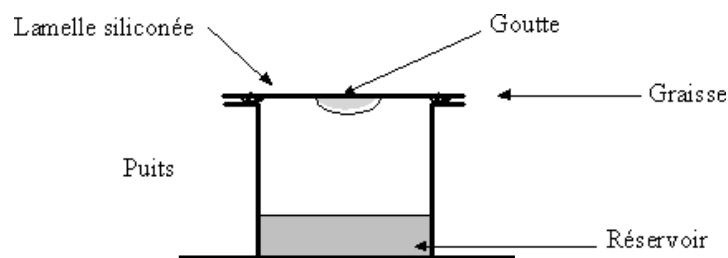


Figure 10 : Cristallisation en goutte suspendue.

Quand un cristal est obtenu, qu'il soit de bonne ou de mauvaise qualité, et de taille suffisante pour une expérience de diffraction ou non, il pourra être utilisé pour faire le micro-ensemencement d'autres gouttes. Pour ce faire, le cristal devra être écrasé en une myriade de

petits morceaux, et ces fragments, dilués dans une solution de liqueur mère. Ensuite, grâce à une moustache de chat, on pourra pêcher les micro-cristaux et les transférer dans d'autres gouttes, où ils serviront comme initiateurs de la croissance cristalline.

III-3.2 : Montage de cristaux en vue d'une expérience de diffraction :

Pour collecter des données de diffraction à température ambiante, il faudra monter le cristal d'intérêt dans un capillaire. Ce dernier, hermétiquement scellé à ses deux extrémités par de la cire, sera ensuite fixé par de la pâte à modeler sur la tête goniométrique du diffractomètre. Les cristaux de protéines contiennent, nous l'avons dit, un très large pourcentage volumique de solvant ; il faudra donc prévoir de laisser un volume suffisant de liqueur-mère dans le capillaire afin d'éviter la déshydratation du cristal. Les collectes de données à température ambiante ne se feront, en pratique, que sur des diffractomètres de laboratoire : ces derniers, relativement peu puissants, n'induiront quasiment pas de dommages d'irradiation. Cependant, si la source de rayons X est un synchrotron, les dommages d'irradiation entraîneront, irrémédiablement et dans un laps de temps très court, la destruction du cristal à température ambiante. La cryo-cristallographie (Hope, 1988 ; Hope, 1990 ; Garman, 1999) permet de réduire l'endommagement des cristaux par les rayons X. En effet, un cristal peut subir une irradiation 70 fois plus longue à température cryogénique qu'à température ambiante (Nave et Garman, 2005).

De fait, dans un synchrotron, la collecte des données de diffraction se fait le plus souvent à température cryogénique, *i.e.* autour de 100K. Une collecte de données à température cryogénique nécessite, à l'évidence, un dispositif plus adapté que les capillaires en vue de mettre les cristaux en condition de diffraction. C'est ainsi qu'ont été inventées les « cryo-

boucles » (ou cryo-loops – Teng, 1990 – Figure 11a), qui permettent de pêcher et de transférer très rapidement un cristal sur une tête goniométrique où un flux d'azote gazeux à 100K, aligné sur la position du cristal, permettra son refroidissement par trempe ultra-rapide ou « flash-cooling ». Ce « flash-cooling », est la condition *sine qua none* pour collecter des données à température cryogénique (Garman, 2003 ; Juers & Matthews, 2001). Il faudra, en effet, éviter la formation de glace à l'intérieur des canaux de solvant du cristal (Figure 11b), ce qui réclamera à la fois la présence d'un cryoprotectant adapté et le flash-cooling du cristal ainsi protégé. Un cryoprotectant est une substance, ou une solution, qui, refroidie rapidement à une température cryogénique, ne congèle pas, mais forme plutôt un matériau amorphe, *i.e.* dont la structure est celle d'un verre (*i.e.* un liquide figé – Figure 11b). La nature du cryoprotectant à utiliser, ainsi que sa concentration, dépendront très fortement de la composition de la liqueur mère ; de fait, il faudra souvent tester une très large gamme de cryoprotectants et, pour chacun, plusieurs concentrations, avant de trouver les conditions idéales de cryoprotection. Les cas les plus difficiles seront ceux où le cristal a poussé à partir d'une solution à forte teneur en sels ; on ajoutera alors, le plus souvent, un pourcentage approprié de sucres (par exemple, le tréhalose ou le sucrose) ou d'alcools (par exemple, l'isopropanol ou le glycérol) à la solution de liqueur mère, la rendant ainsi assez visqueuse pour être « flash-coolée » sans risque d'apparition de cristaux de glace. Les cas les plus favorables seront ceux où l'agent précipitant, utilisé pour la cristallisation, est lui-même un cryoprotectant ; ce sera le cas des PEG de faible poids moléculaire, notamment. Dans ce cas, mais également lorsque les canaux de solvant du cristal sont de petite taille, on pourra directement « flash-cooler » le cristal dans le flux d'azote gazeux à 100K. Le cristal pourra être préalablement trempé dans une solution d'huile (par exemple, de l'huile de paratone ou de paraffine), afin d'éliminer un maximum du solvant environnant, et donc diminuer sa diffusion des rayons X, tout en protégeant le cristal contre l'assèchement.

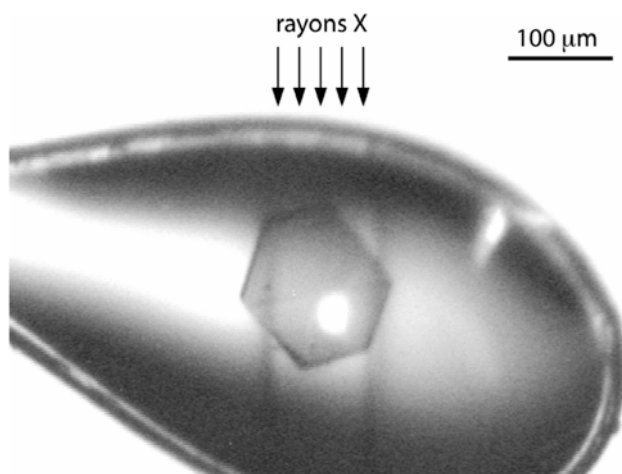


Figure 11a : Un cristal ($P2_1$) de myoglobine de cachalot après collecte d'un jeu de données à 100 K sur ID14-EH4 à l'ESRF. Le crystal est contenu dans une « cryo-loop ». On peut noter la trace laissée par le faisceau de rayons-X, d'une largeur de 100mm, sur le cristal et le solvant environnant (reproduit de Weik, 2006).

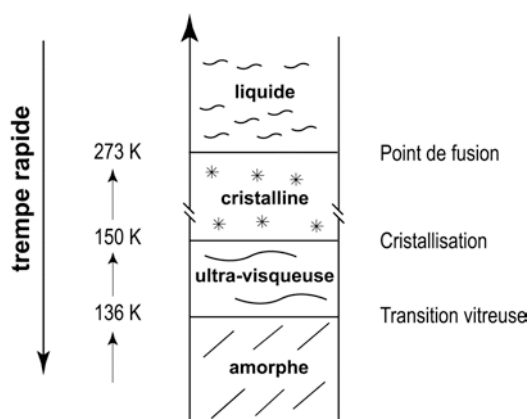


Figure 11b : Les différents états de l'eau trempée rapidement (ou « flash-coolée ») à basse température, à pression atmosphérique (reproduit de Weik, 2006 – d'après Mishima & Stanley, 1998).

III-3.3 : Collecte de données cristallographiques :

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde varie entre 0.1 et 100 Å. Pour obtenir la structure à résolution atomique d'une molécule, il faudra utiliser des rayons X dont la longueur d'onde est de l'ordre de la distance inter-atomique la plus petite, *i.e.* autour de 1 Å. Les rayons X qui pénètrent un cristal seront diffusés par les électrons des atomes qu'il contient. La diffraction est un cas particulier de la diffusion ; alors que dans une

expérience de diffusion, les rayonnements (X ou autres) sont propagés dans toutes les directions de l'espace, ceci n'a lieu, dans le cas de diffraction, que dans quelques directions discrètes et définies. La diffraction des rayons X (RX) par un cristal peut être définie comme le résultat des interférences, constructives et destructives, entre les rayonnements diffusés par les électrons de chacun des différents atomes qu'il contient. Les rayons X diffusés ne pourront interférer de façon constructive que s'ils sont en phase, ce qui restreindra l'observation des taches de diffraction à quelques directions bien définies de l'espace.

Au sein d'un laboratoire de cristallographie, la source de rayons X sera, le plus souvent, un générateur à anode tournante. Le principe de fonctionnement de ce type d'appareil est le suivant : l'anode, une plaque métallique en cuivre ou en molybdène, est bombardée par des électrons, et émet, en conséquence, des rayons X à une longueur d'onde donnée (1.54 et 0.70 Å pour le cuivre et le molybdène, respectivement). Afin de permettre la production de rayons X, les électrons devront être projetés à très grande vitesse sur l'anode. En pratique, ces électrons sont produits par l'application d'un courant électrique sur un fil de tungstène, puis accélérés grâce à une forte différence de potentiel entre l'anode et la cathode. Le rendement de production de rayons X est assez faible, typiquement de l'ordre de 1%, donc 99 % de l'énergie déposée par les électrons sur l'anode sera ré-émise sous forme de chaleur. Pour éviter la surchauffe de l'appareil, l'anode est en rotation constante, et à très haute vitesse ; on parle donc de générateur à anode tournante.

Il existe, de nos jours, des sources de rayons X infiniment plus puissante ($\approx 10^6$) que les générateurs de laboratoire, typiquement les synchrotrons (Mitchell *et al.*, 1999). Un synchrotron est une machine complexe, dont la taille pourra éventuellement avoisiner celle d'un stade, et qui est composée de trois éléments principaux : i/ un accélérateur linéaire, dans lequel des électrons sont accélérés, suivant un principe similaire à celui précédemment décrit

pour les générateurs de laboratoire, *i.e.* sous l'action d'un champ électrique haute tension ; ii/ un « booster », dans lequel les électrons en provenance de l'accélérateur linéaire sont accélérés jusqu'à une vitesse proche de celle de la lumière (env. 300000 km.s^{-1}) ; iii/ un anneau de stockage, dans lequel sont injectés les électrons du booster, sitôt créés. Pendant un certain temps (entre 2 et 12 heures, suivant l'intensité des électrons dans l'anneau), les électrons sont maintenus à vitesse constante, et sur une orbite stable. Ceci est permis par l'alternance continue, sur toute la circonférence de l'anneau, d'aimants de courbure (au niveau desquels ils changent de trajectoire et sont, par voie de fait, décélérés), et grâce à la présence d'une cavité radio-fréquence au niveau de laquelle sont ré-accélérés, à chaque passage, les électrons. A chaque changement de trajectoire, *i.e.* en regard de l'aimant de courbure (Bending Magnet, BM), un rayonnement très intense et très brillant est émis ; on y trouve une très large gamme de longueurs d'onde, allant des ondes radio aux rayons γ , mais avec un maximum d'intensité autour de 1 \AA . Les derniers développements « machine » sur les synchrotrons concernent les éléments d'insertion (Insertion Device, ID). Ces derniers sont, comme leur nom l'indique, « insérés » le long des sections linéaires de ré-accélération des électrons. Une alternance d'ID de pôles positifs et négatifs imprime une trajectoire sinuesque aux électrons qui émettent alors un rayonnement en continu ; ce dernier est beaucoup plus puissant, et surtout plus brillant, que le rayonnement émis en regard d'un aimant de courbure. A titre comparatif, une expérience de trois minutes sur une ligne de lumière ID de l'ESRF de Grenoble, prendrait 3 heures sur une ligne BM et environ 3 jours sur un générateur à anode tournante.

Pour la plupart des expériences de cristallographie menées dans un synchrotron, l'utilisation d'un rayonnement monochromatique est préférable ; un monochromateur sera placé sur le trajet du rayonnement initial, afin d'en extraire un faisceau de longueur d'onde adéquate. La

possibilité de sélectionner la longueur d'onde est le deuxième avantage majeur du rayonnement synchrotron ; cette propriété peut être essentielle, par exemple lors de l'utilisation de diffuseurs anomaux ou d'atomes lourds pour « phaser » un jeu de données (voir plus loin). Seules les expériences de cristallographie polychromatique, suivant la méthode de Laue, exploiteront totalement les possibilités d'un synchrotron, en termes de longueurs d'ondes (voir plus loin).

En suite de l'application d'un rayonnement X sur un cristal, il faudra pouvoir détecter les rayonnements diffractés et mesurer leurs intensités. Les détecteurs les plus fréquemment rencontrés, et souvent en conjonction avec des diffractomètres de laboratoire, sont de type « Image Plate » (IP – Amemiya, 1995). Un détecteur de type IP consiste en une plaque de plastique flexible, recouverte par un réseau très uniforme de microcristaux d'un composé phosphoré photosensible, capable de stocker l'énergie des rayons X (RX). Après une exposition aux RX, l'IP est « lue » en stimulant le phosphore par la lumière visible ; en conséquence, il réémet un rayonnement dont l'intensité sera proportionnelle à celle des rayons X absorbés. Après analyse complète, une exposition plus franche à la lumière visible est nécessaire pour effacer la plaque ; c'est cette étape qui, dans le cas des détecteurs IP modernes, prendra le plus de temps (quelques minutes). Le « read-out time » est donc la principale limite de ce type de détecteurs. Ils sont, pour cette raison, rarement utilisés dans les synchrotrons, où les temps d'exposition sont typiquement de l'ordre de 0.5 à 60 secondes, et un « read-out time » de plusieurs minutes par conséquent inacceptable.

Il existe un autre type de détecteur, les détecteurs CCD (Charge – Coupled Device) : leur « read-out time » est compris entre 0.2 et 1 seconde ; ils sont donc beaucoup plus adaptés pour les lignes de synchrotrons (Westbrook *et al.*, 1997). L'excitation, par des photons visibles, des

électrons du silicium de chaque pixel du CCD génère une charge qui sera, au moment de la lecture, amplifiée puis convertie en un signal numérique. Les photons visibles, qui excitent les pixels du CCD, sont en fait générés par la surface avant du détecteur ; celle-ci contiendra un composé phosphoré qui, à chaque photon X absorbé, réémettra un photon visible.

III-3.4 : Dommages d'irradiation X:

Les avantages premiers du rayonnement synchrotron sont, à l'évidence, sa puissance et sa brillance. Son désavantage majeur sera le dommage d'irradiation. Il a été calculé qu'un cristal de protéine à 77 K perd la moitié de son pouvoir diffractant après avoir reçu une dose (dose = énergie déposée par unité de masse) de 2×10^7 Gray (Gy ; $\text{Gy} = \text{J kg}^{-1}$ – Henderson, 1990). Une valeur similaire a récemment été déterminée expérimentalement (*i.e.* 4.3×10^7 Gy, Owen *et al.*, 2006), mais les auteurs suggèrent que l'information biologique, contenue dans une structure cristallographique de protéine, commence à être compromise à partir de 3×10^7 Gy ('limite Garman'). Cette limite peut être atteinte au bout de 2.5 ans, en utilisant une source de rayons X de laboratoire, au bout d'une journée, dans un synchrotron de 2^{ème} génération, et au bout de quelques quelques minutes, sur une ligne d'insertion d'un synchrotron de 3^{ème} génération (Garman, 2003). C'est pourquoi une attention particulière doit être portée à la stratégie de collecte de données. Les dommages d'irradiation se traduisent par une diminution progressive du pouvoir de diffraction du cristal, une augmentation de la mosaïcité, du facteur B de Wilson (Gonzalez & Nave, 1994) et du volume de la maille élémentaire (Ravelli *et al.*, 2002). Ces dommages sont hautement spécifiques (Weik *et al.*, 2000 ; Ravelli & McSweeney, 2000 ; Burmeister, 2000 ; Leiros *et al.*, 2001 ; Weik *et al.*, 2002) et touchent en premier lieu les ponts disulfures et les groupements carboxyliques, qui se voient rompus par l'irradiation X.

III-3.5 : Traitement de données cristallographiques :

Un cristal, de protéines ou non, peut être assimilé à un ensemble infini de plans. Pour chaque orientation du cristal dans un faisceau de RX, il y aura plusieurs plans à partir desquels ils seront diffractés. Chacun de ces plans du cristal est responsable de l'apparition d'une tache de diffraction, dont l'intensité et la position sont enregistrées par le détecteur. Ces taches de diffraction sont appelées « réflexions », car elles sont le résultat de la réflexion, par des plans donnés du cristal, du faisceau de RX incident. La Figure 7 montre un exemple typique de cliché de diffraction, collecté à partir d'un cristal trigonal de *TcAChE*. A chaque cliché de diffraction correspondra un certain angle d'oscillation (1 degré d'oscillation dans le cas de la Figure 7, par exemple) ; un jeu de données complet consiste en la combinaison de dizaines, voire de centaines, de clichés de diffraction, chacun d'entre eux correspondant à une orientation légèrement différente. L'espace dans lequel sont contenues les réflexions est nommé espace réciproque, par opposition à l'espace réel du cristal ou de la molécule cristallisée. Pour résoudre la structure en trois dimensions d'un objet biomoléculaire donné, il faudra enregistrer la totalité de l'espace réciproque. Etant donnée la symétrie cristallographique et la centrosymétrie du réseau réciproque, il faudra rarement plus de 180° d'oscillation pour obtenir la totalité de l'espace réciproque.

L'espacement des taches de diffraction sur un cliché est inversement proportionnel à la taille de la maille : un espacement large entre les réflexions signifie que la maille, et par conséquent l'objet contenu dans celle-ci, sont petits, et *vice versa*. Le cliché de diffraction peut également fournir d'autres informations concernant la géométrie du cristal : selon la symétrie du cristal

considéré, des angles de 45, 60, 90 ou 120 degrés pourront être observés entre les directions sur lesquelles s'alignent les taches de diffraction.

Sur la Figure 7, on voit clairement que les réflexions au centre du cliché (basse résolution) ont des intensités relativement plus fortes que leurs homologues sur le bord (haute résolution). La limite en résolution d'un jeu de données déterminera donc à la fois sa qualité mais aussi le niveau de détail de la structure qui en résultera. Plus la résolution sera haute, plus on aura de taches de diffraction, et plus sera détaillée l'information structurale, *i.e.* la carte de densité électronique. Par ailleurs il faudra, idéalement, conserver un rapport « observations indépendantes » / « paramètres affinés » supérieur à 1.5 ; dans un cas classique, *i.e.* si l'on affine quatre paramètres par atome (positions x , y , z ; facteur d'agitation thermique), il faudra donc 4.5 fois plus de taches de diffraction uniques que d'atomes dans la structure. La résolution d'un jeu de données sera exprimée en Angströms ; plus ce chiffre sera petit, et plus haute sera la résolution.

La première étape du traitement de données est l'indexation de l'ensemble des taches collectées afin de déterminer la taille de la maille du cristal et d'assigner chaque réflexion à un point du réseau réciproque. Le réseau réciproque, *i.e.* celui qu'on observe et enregistre sur les clichés de diffraction, est la transformée de Fourier du réseau cristallin, qui appartient quant à lui à l'espace réel. La transformée de Fourier d'un réseau est un autre réseau, inversé en dimensions et centro-symétrique ; en conséquence, on assigne à chacune des réflexions un point particulier du réseau réciproque, grâce à 3 indices h , k et l , nommés indices de « Miller ».

La seconde étape consiste à déterminer l'intensité de toutes les réflexions mesurées ; on parle d'intégration. Pratiquement, les pixels participant à chaque tache, ou spot, sont recensés et

leurs intensités sommées. Après analyse globale de la forme des spots enregistrés, l'intensité correspondant à chacun d'entre eux est intégrée sur tous les pixels concernés, par ajustement de la somme des intensités mesurées avec la courbe théorique décrivant au mieux leur forme.

Quand les indices et l'intensité de chaque réflexion ont été attribués, la troisième étape du traitement de données est la moyennation de l'intensité des réflexions équivalentes. Les réflexions équivalentes sont celles qui sont liées par les opérations de symétrie cristallographique. En théorie, *i.e.* si le cristal était parfait, leurs intensités devraient avoir exactement la même valeur. Les cristaux parfaits n'existant pas, on calcule, en pratique, une valeur moyenne d'intensité à partir de toutes les réflexions équivalentes ; l'écart type sur cette valeur est nommé R_{sym} , et il sera un des indicateurs de la qualité du jeu de données. Pour un cristal parfait, *i.e.* dont les taches équivalentes auraient exactement les mêmes intensités, il serait égal à 0 % ; en cristallographie des protéines, il sera le plus souvent compris entre 5 et 15 %, pour l'ensemble du jeu de données. Sa valeur dans la dernière tranche de résolution doit idéalement être inférieure à 50 %.

Au terme de ces trois étapes (indexation, intégration et moyennation), une liste des réflexions uniques est générée ; elles sont triées par indice et à chacune d'entre elles sont associées, une valeur moyenne d'intensité (I) et la déviation standard sur cette dernière ($\sigma(I)$). Les programmes généralement utilisés en vue d'indexer, d'intégrer et de mettre à l'échelle des données cristallographiques sont XDS (Kabsch, 1993) et MOSFLM (Leslie, 1999 ; 2006). Il faut noter que le rapport $I/\sigma(I)$ est également un indicateur de qualité du jeu de données ; idéalement il doit rester supérieur à 2 dans toutes les tranches de résolution intégrées.

III-3.6 – Résolution d'une structure cristallographique :

La principale difficulté, lors de la résolution d'une structure à partir de données cristallographiques, réside dans le fait que la partie essentielle de l'information requise pour atteindre ce but ne peut être mesurée expérimentalement. Les RX, comme toutes les autres formes d'ondes électromagnétiques, auront une phase et une amplitude. L'intensité des RX diffractés sera corrélée au pouvoir diffusif des atomes sur le plan desquels ils ont été réfléchis, et la phase, à la position des atomes dans ce plan. Pour obtenir une représentation tridimensionnelle des atomes des molécules qui composent un cristal, il faudra disposer de l'intensité et de la phase de chacune des réflexions obtenues après diffraction des RX sur ce cristal. Dans une expérience de cristallographie aux rayons X, on ne mesure que l'intensité des taches de diffraction, la phase restant, quant à elle, inconnue.

Différentes techniques existent, qui permettent de phaser un jeu de données, autorisant ainsi la résolution de la structure. Toutes s'appuient sur la mise en place d'interférences (Hauptman, 1997). Certaines méthodes prennent avantage de la complexation du cristal de protéine avec des atomes lourds, dont le pouvoir diffusif, proportionnel au nombre d'électrons, sera très élevé. D'autres s'appuient sur l'introduction de diffuseurs anomaux dans la protéine, en remplaçant, par exemple, les résidus méthionines par des résidus séléno-méthionine (la séléno-méthionine présente un atome de sélénium, diffuseur anomal, en lieu et place de l'atome de soufre présent dans une méthionine classique). Avantage est également parfois pris des dommages d'irradiation aux rayons X ; en effet si la structure « change » sous l'effet des rayons X, les phases également, et cette différence peut dans certains cas être suffisante pour phaser un jeu de données. Le cas le plus favorable reste néanmoins celui où la structure d'une protéine homologue est déjà connue ; on utilisera alors la structure de cette dernière

pour phaser, approximativement, le jeu de données de la protéine d'intérêt. Toutes les méthodes de phasage sont basées sur l'utilisation de la transformée de Fourier, qui relie l'information structurale présente dans un cristal, et l'intensité et la phase des réflexions enregistrées après diffraction des rayons X par ce cristal. Pour cette raison, les réflexions sont également appelées facteurs de structure. Un facteur de structure est un nombre complexe, dont l'amplitude est proportionnelle à la racine carrée de l'intensité mesurée, et dont la phase, inaccessible par la seule expérience de diffraction, devra être déterminée par les méthodes *sus-citées*.

Les deux méthodes de phasage basée sur l'utilisation de complexes avec des métaux lourds sont nommées, respectivement, MIR (Multiple Isomorphous Replacement) et SIR (Single Isomorphous Replacement). Comme leur nom l'indique, elles ne diffèrent que dans le nombre de complexes nécessaires au phasage du jeu de données. En MIR, plusieurs complexes (au moins 2) sont utilisés, ce qui permet d'obtenir une solution de phasage univoque. En SIR, par opposition, un seul complexe est utilisé et la solution de phasage est donc double ; en conséquence, l'expérimentateur devra lui-même tester, par phase, les deux possibilités afin de déterminer laquelle satisfera au mieux son jeu de données. Le principe de phasage sous-jacent à ces deux méthodes repose sur l'introduction, dans la structure de la protéine, d'atomes dont le pouvoir diffusif sera largement supérieur à celui des atomes la constitue (carbone, azote, oxygène, soufre). Cette complexation atome lourd – protéine pourra résulter d'un trempage du cristal ou d'une co-cristallisation directe. Le pré-requis à l'utilisation de ces méthodes sera la similitude entre les structures native et complexée(s) à un (ou des) atome(s) lourd(s), *i.e.* que la fixation du métal sur la protéine devra ne pas changer sa structure ; ainsi le cristal restera ordonné, et ses paramètres de maille seront constants : on parlera alors d'isomorphisme entre les cristaux. Pour chaque réflexion, la différence entre les intensités mesurées sur le cristal

natif et le (ou les) cristal (cristaux) dérivé(s), sera due uniquement à l'introduction de l'atome lourd. Il sera relativement aisé de localiser ces atomes, grâce à une carte de Patterson (résultat de la convolution du jeu de données par lui même), ce qui permettra ensuite d'estimer leur contribution, en phase et en amplitude, dans la différence d'intensité observée entre les jeux de données natifs et dérivés. On pourra alors retrouver les phases du jeu de données natif et ainsi résoudre la structure de la protéine.

Les méthodes de phasage basées sur l'utilisation de diffuseur anomaux (Ealick, 2000) sont nommées MAD (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion) ou SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion), et analogiquement au MIR et au SIR, diffèrent par le nombre de longueurs d'onde à utiliser pour résoudre le problème de phase. Pour ces méthodes, un seul dérivé sera suffisant (*i.e.* un seul complexe de la protéine avec un diffuseur anomal donné). Le principe de la diffusion anormale repose sur la propriété qu'ont certains atomes lourds d'absorber et de fluorescer dans le domaine des RX. Ce phénomène va entraîner un décalage de phase entre les réflexions centrosymétriques (par exemple, des réflexions d'indices $[h, k, l]$ et $[-h, -k, -l]$) qui, alors qu'elles auraient été équivalentes en absence de diffusion anormale (Loi de Friedel), n'auront désormais plus la même amplitude, (Hendrickson, 1991). La diffusion anormale dépend de la longueur d'onde utilisée ; ainsi, en collectant plusieurs jeux de données à différentes longueurs d'onde, sur un même cristal ou sur des cristaux de contenu identiques, on pourra retrouver l'information de phase. La nécessité de changer la longueur d'onde au cours de l'expérience rend cette méthode quasiment tributaire du rayonnement synchrotron. Il faudra en effet se placer à certaines longueurs d'onde bien définies en vue de phaser des données cristallographiques avec un diffuseur anomal donné.

La méthode RIP (Radiation-Induced Phasing – Ravelli *et al.*, 2005 ; Nanao *et al.*, 2005) est basée sur l'exploitation des dommages d'irradiation. Dans cette approche, un premier jeu de données est collecté sur le cristal, en utilisant une faible dose de rayons X ; c'est le jeu « natif ». Le cristal est ensuite soumis à un « burn » de rayons X, *i.e.* exposé pendant un temps équivalent à celui nécessaire à la collecte de plusieurs (5 à 10) jeux de données. Un deuxième jeu de données est alors collecté, avec la même dose de rayons X que le premier ; c'est le jeu « dérivé ». Comme nous l'avons introduit plus haut, les dommages d'irradiation sont relativement spécifiques et touchent en premier lieu les ponts disulfures. Ces dommages vont induire des changements de phases entre le jeu « natif » et le jeu « dérivé », qui pourront être utilisés pour phaser la structure, d'une façon purement analogue à celle d'un phasage MIR. L'avantage premier de la méthode RIP est qu'elle est en théorie applicable par tous les utilisateurs de rayonnement synchrotron à toutes les protéines contenant des ponts disulfures. La réalité expérimentale veut qu'elle ne fonctionne qu'avec des cristaux de protéines présentant une très bonne diffraction, de l'ordre de 1 à 1.5 Å, généralement (Ravelli *et al.*, 2005 ; Nanao *et al.*, 2005).

Aucune des trois méthodes sus-citées n'a été nécessaire pour phaser les jeux de données collectés au cours de cette thèse. En effet, nos travaux ont porté sur des complexes de la TcAChE, dont la structure native était déjà résolue, avec différents ligands, substrats, produits et « produits-en-cage ». De fait, avantage a pu être pris de la méthode dite de Remplacement Moléculaire. Celle-ci s'appuie sur la possibilité de générer, à partir d'une structure connue et pour un groupe d'espace donné, un jeu de facteurs de structure, avec phases et amplitudes, qui pourra ensuite être utilisé pour la détermination de structure. Dans le meilleur des cas, *i.e.* quand il s'agit de la même protéine cristallisée dans le même groupe d'espace, l'introduction d'un ligand, par trempage ou après co-cristallisation, n'entraîne le plus souvent que de subtils

changements de conformation, de position ou d'orientation ; on pourra alors faire un affinement par « corps rigide » (rigid-body refinement), assez rapide, qui replacera rapidement la protéine dans la carte de densité expérimentale.

Cependant, des changements d'orientation et/ou de position plus significatifs peuvent parfois avoir lieu, même après un simple trempage ; il se pourra même, à la suite d'une co-cristallisation avec un ligand par exemple, que le groupe d'espace du cristal ait changé. Dans ces cas, l'affinement par corps rigide ne suffira pas, et un remplacement moléculaire complet sera nécessaire (Rossman *et al.*, 1962). La structure connue sera alors utilisée afin de retrouver l'orientation (« rotational search ») et la position (« translational search ») de la protéine dans la nouvelle forme cristalline. Le succès de cette méthode dépendra de la similarité entre la structure connue et la structure recherchée.

III-3.7 : Affinement d'une structure cristallographique :

Une fois qu'un modèle initial a été obtenu, l'agrément entre les facteurs de structure calculés à partir de ce modèle (F_{calc}) et ceux expérimentalement observés (F_{obs}) sera ajusté par un processus d'affinement. Pour ce faire, des cartes de densité électronique sont calculées, en utilisant la transformée de Fourier, à partir des amplitudes des facteurs de structure observés et calculés, et des phases des facteurs de structure calculés. Une carte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ ou $3F_{\text{obs}} - 2F_{\text{calc}}$ génère une densité électronique autour de tout le modèle (résidus de la protéine, carbohydrates, molécules d'eau, ligands ...); elle rend donc compte des données expérimentales mais est fortement biaisée par le modèle. C'est pourquoi on utilise, en complément, une carte $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, ou carte de densité différence, qui rend compte des dissemblances entre le modèle et les données expérimentales : on verra apparaître de la

densité négative sur les éléments présents dans le modèle, mais qui ne devraient pas l'être selon les données expérimentales ; et de la densité positive aux endroits où, selon les données expérimentales, il faudrait modéliser de nouveaux atomes.

La procédure d'affinement consiste en deux étapes, répétées itérativement jusqu'à ce qu'un modèle valable, supporté par l'absence de densité différence dans les cartes $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, soit obtenu. Des programmes permettant l'affichage des structures et des cartes de densités électroniques sont utilisés pour reconstruire le modèle dans l'espace réel, *i.e.* celui de la densité électronique (par exemple, TURBO-FRODO : Roussel & Cambillau, 1989 ; COOT : Emsley & Cowtan, 2004). Le modèle modifié est alors soumis à une procédure d'affinement automatique dans l'espace réciproque, qui tendra à minimiser les différences entre les facteurs de structure calculés (à partir de ce modèle) et observés (au cours de l'expérience de diffraction). Cette minimisation sera pondérée par l'introduction de contraintes géométriques, rendant compte de la chimie des éléments constitutifs d'une protéine, et nécessaires à l'obtention d'un modèle valable. Ces contraintes concerneront, typiquement, les longueurs de liaison covalentes, les angles de liaisons, les angles de torsion, etc, ... Plus la résolution d'un jeu de données sera élevée, et plus on pourra se permettre de diminuer le poids des contraintes géométriques par rapport à celui des rayons X. Les deux programmes les plus couramment utilisés pour l'affinement dans l'espace réciproque sont CNS (Brünger *et al.*, 1998) et le module REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) de la suite CCP4 (CCP4, 1994).

La progression de l'affinement et la qualité du modèle final seront jugés par un facteur de désaccord, ou facteur R (exprimé en %) : plus ce facteur sera faible, et plus le modèle pourra être jugé valable à une résolution donnée. En addition, et afin de se prémunir contre le « sur-affinement », une partie des données (typiquement, entre 5 et 10%) sera exclue de la

procédure d'affinement et utilisée pour une validation croisée du modèle (Brünger *et al.*, 1992). On entend, par validation croisée, l'estimation de la validité de l'affinement par un groupe de réflexions n'ayant pas été incluses dans les procédures d'affinements (*i.e.* qui n'ont été utilisées ni dans le calcul des cartes, ni dans la minimisation). La validation croisée permet de calculer un facteur R « libre », ou R_{free} , qui ne sera pas biaisé par la procédure d'affinement. Le suivi, tout au long de la procédure d'affinement, de la différence entre les facteurs R et R_{free} , constitue une sorte de « garde-fou » contre les risques de sur-affinement d'une structure. En dernier lieu, le modèle sera confronté à une analyse de fond de ses paramètres géométriques, lesquels seront comparés avec les valeurs théoriques attendues (Laskowski *et al.*, 1993).

III-4 – Cristallographie cinétique

III-4.1 : Etat de l'art

Une structure tridimensionnelle de protéine, résolue par les méthodes conventionnelles de cristallographie aux rayons X, est toujours une moyenne de l'ensemble des structures présentes au sein du cristal. Par ailleurs, et même si le cristal est refroidi par « flash-cooling » avant l'expérience (en effet, une structure « respire » même à 100 K, quoique faiblement), la structure obtenue est également moyennée sur le temps. Au final, elle prend en compte des événements tels que la diffusion de solvant, la rotation des chaînes latérales et, possiblement, les réactions chimiques « en cours » durant la collecte de données. Mais, quelles que puisse être la diversité des conformations présentes dans le cristal, la structure résolue n'en est pas moins statique, ce qui ne rend à l'évidence pas compte de sa réalité biologique.

En effet, une composante dynamique sera nécessaire pour expliquer et comprendre le fonctionnement d'une macromolécule biologique. Ce sont en effet les mouvements (lents (10^{-6} à 10^{-2} s⁻¹) ou rapides (10^{-12} à 10^{-7} s⁻¹), de petite (10^{-11} à 10^{-10} m) ou de large (10^{-9} à 10^{-8} m) amplitude) qui animent une structure qui seuls peuvent, *in fine*, lui conférer une activité. À l'évidence, ces mouvements dépendent eux-mêmes très intimement de la structure. Les différentes conformations accessibles à une protéine donnée forment son paysage conformationnel ; il sera d'autant plus complexe que la protéine le sera elle-même. En 1991, Frauenfelder a proposé qu'il puisse exister une corrélation forte entre le paysage conformationnel d'une protéine, les mouvements qui lui sont autorisés et son activité biologique à proprement parler (Figure 12 – Frauenfelder *et al.*, 1991). Ainsi, il existerait deux types de mouvements au sein des protéines : ceux, harmoniques, qui permettent à la protéine de « lubrifier » sa structure et de gagner en mobilité ; et ceux, anharmoniques, qui permettent des sauts entre les différents puits de potentiels autorisant, ainsi, l'occurrence d'une fonction. Ceci a été confirmé le cas de deux protéines modèles, étudiées aussi intensivement qu'extensivement en biophysique, la bactériorhodopsine (BR – Rousso *et al.*, 1997 ; Subramaniam & Henderson, 1999 ; Wang & El-Sayed, 1999 ; Pebay-Peyroula *et al.*, 2002 ; Lee & Krauss, 2004) et la myoglobine (MB – Leeson & Wiersma, 1995 ; Parak & Nienhaus, 2002 ; Fenimore *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004).

Mais, si un ou plusieurs états intermédiaires se forment au cours d'un cycle catalytique, comment les caractériser structuralement ?

C'est précisément le but et le « challenge » de la cristallographie cinétique (Petsko & Ringe, 2000 ; Bourgeois & Royant, 2005). Depuis plus de 25 ans (Fink & Petsko, 1981 ; Douzou & Petsko, 1984 ; Hajdu, 1988 ; Moffat, 1989 ; Johnson, 1992), plusieurs équipes à travers le monde se sont focalisées sur le développement de méthodes dynamiques en cristallographie

des protéines, qui ne permettraient plus seulement de prendre des « photos », mais aussi de « filmer » les protéines en action. On peut distinguer deux grandes approches en cristallographie cinétique : celles basées sur le piégeage d'états intermédiaires de réaction (cristallographie monochromatique) et celles visant à littéralement « filmer » la protéine en temps réel (cristallographie polychromatique, dite « de Laue »).

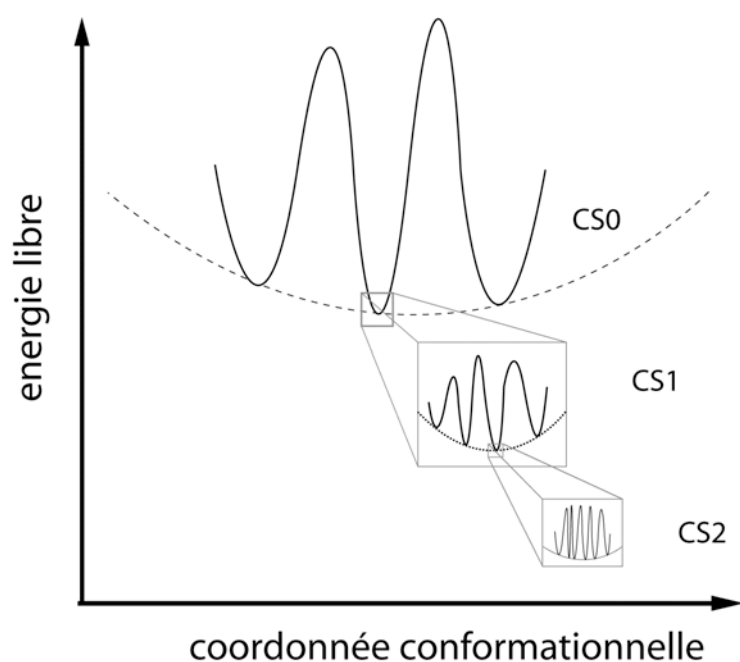


Figure 12 : Les différents sous-états conformationnels d'une protéine correspondent aux niveaux de plus basse énergie dans son paysage énergétique (reproduit de Weik, 2006 – d'après Frauenfelder *et al.* 1991). Ici, le paysage énergétique est projeté sur une seule coordonnée conformationnelle. Il possède, en réalité, un très grand nombre de coordonnées ; il n'en sera que plus complexe.

La méthode de Laue (Moffat *et al.*, 1989 ; Hadju *et al.*, 1991) repose sur l'utilisation d'un rayonnement polychromatique ; en pratique, elle n'est utilisée que dans un synchrotron. L'avantage majeur de cette méthode est de réduire considérablement les temps d'exposition par image, qui seront typiquement de l'ordre de la milliseconde, voire de la microseconde, et donc particulièrement bien adaptés en vue de caractériser un état intermédiaire de courte durée de vie. De plus, les clichés de type Laue contiennent beaucoup plus d'informations (*i.e.* de réflexions) que les clichés monochromatiques, et il faut donc moins d'images pour résoudre la structure. En effet, la diffraction a lieu à chaque intersection du réseau réciproque avec les multiples sphères d'Ewald de rayons $1/\lambda$, $2/\lambda$, $3/\lambda$, $4/\lambda$, $5/\lambda$... et le cliché de

diffraction est donc excessivement plus chargé. C'est d'ailleurs un des désavantages majeurs de cette méthode. Le traitement de données Laue est, en pratique, beaucoup plus compliqué qu'un traitement classique de données monochromatiques. Il faut en effet veiller à attribuer la bonne longueur d'onde à chaque réflexion et, en fonction de celle-ci, appliquer le bon facteur de correction pour l'intensité du faisceau incident à cette longueur d'onde particulière. Certaines réflexions, multiples (*i.e.* qui résultent de la diffraction, dans la même direction, de deux faisceaux de RX de longueurs d'onde différentes), doivent par ailleurs être déconvoluées. Enfin, les forts dommages d'irradiation, le relativement faible rapport signal sur bruit et la difficulté pour obtenir des données à haute résolution, rendent cette méthode, pourtant dédiée à la cristallographie cinétique, difficile à mettre en œuvre dans la plupart des cas. Elle n'a d'ailleurs été appliquée avec succès que sur quelques protéines à ce jour, parmi lesquelles la chymotrypsine (Stoddard *et al.*, 1991), la myoglobine (MB – Bourgeois *et al.*, 2003 ; Schotte *et al.*, 2003 ; Bourgeois *et al.*, 2006) et la « photoactive yellow protein » (PyP – Schmidt *et al.*, 2004 ; Ihee *et al.*, 2005 ; Rajagopal *et al.*, 2005 ; Schmidt *et al.*, 2005). Une étude sur l'AChE avait également été initiée (Ravelli *et al.*, 1998 ; Raves, 1998), mais la conjonction de l'ensemble des difficultés susmentionnées et de la mosaïcité relativement élevée des cristaux de TcAChE, l'a rendu impropre pour ce type d'expérience (Bourgeois & Weik, communication personnelle).

Afin de fournir des alternatives à la diffraction de Laue, d'autres méthodes ont été développées visant à piéger des états intermédiaires de réaction, en vue de les caractériser structuralement. Ce but peut être atteint en utilisant des mutants, (Miller *et al.*, 2002 ; Nienhaus *et al.*, 2005) ou des analogues de substrats (Harel *et al.*, 1996 ; Fioravanti *et al.*, 2003 ; Hiratake, 2005), qui bloquent une étape donnée de la réaction enzymatique. On peut également prendre avantage du « flash-cooling » pour piéger un état intermédiaire de réaction.

Dans ce cas, deux stratégies peuvent être employées : la stratégie « trigger – freeze », *i.e.* que la réaction est déclenchée avant le flash-cooling (Fiedler *et al.*, 2002 ; Fedorov *et al.*, 2003 ; Karlsson *et al.*, 2003 ; Theisen *et al.*, 2004 ; Prigge *et al.*, 2004 ; Kort *et al.*, 2004) ; ou la stratégie « freeze – trigger », *i.e.* que la réaction est déclenchée après le flash-cooling (Adachi *et al.*, 2003 ; Sugishima *et al.*, 2004 ; Anderson *et al.*, 2004 ; Edman *et al.*, 2004). Il faut noter que cette dernière stratégie suppose que la réaction puisse être déclenchée à température cryogénique ; elle sera, de fait, le plus souvent appliquée à des protéines photosensibles. Enfin, une dernière approche pourra être utilisée, qui se fondera sur la mise en équilibre du système considéré ; ce but peut être atteint grâce à un système de « stop-flow » (Yamashita *et al.*, 2003).

III-4.2 : Pré-requis en vue d'une étude de cristallographie cinétique :

Avant de s'engager dans une étude de cristallographie cinétique, il faudra s'assurer que trois conditions soient remplies : i/ la protéine doit être active au sein du cristal ; ii/ l'initiation de la réaction doit pouvoir être synchronisée sur l'ensemble des molécules du cristal (soit environ 10^{14} molécules) ; iii/ le temps de vie de l'état intermédiaire doit être supérieur au temps de collecte. Ce sont les pré-requis de la cristallographie cinétique.

A/ Activité au sein du cristal : c'est la condition primordiale en vue d'une étude de cristallographie cinétique (Mozzarelli & Rossi, 1996). Plusieurs facteurs pourront influencer l'activité d'une enzyme cristalline, typiquement la stringence du milieu dans lequel elle a cristallisé (pH, force ionique, température, présence ou non d'inhibiteurs, etc...) et la flexibilité qu'elle a pu conserver. Ainsi il faudra, pour conserver l'enzyme active au sein du cristal, que le pH et la température de cristallisation n'y soient pas trop défavorables, que le

(ou les) agent(s) précipitant(s) ne soient pas des inhibiteurs de l'enzyme, et que les changements conformationnels nécessaires à la survenue de la catalyse soient, le cas échéant, autorisés par les contacts cristallins.

B/ Synchronisation : Une structure tridimensionnelle déterminée par cristallographie aux rayons X est toujours une moyenne des structures présentes au sein du cristal au moment de la collecte. De fait, en cristallographie cinétique, une attention particulière devra être portée à la synchronisation de l'initiation de la réaction afin que toutes les molécules du cristal soient, à chaque instant, dans la même conformation. Le cas le plus simple sera celui des protéines à photosensibilité endogène ; l'illumination du cristal, à une longueur d'onde appropriée, permettra un déclenchement synchrone de la réaction dans tout le cristal. Plus généralement, *i.e.* quand la protéine ne sera pas photosensible, il faudra inactiver, temporairement et réversiblement, le complexe enzyme – substrat. Ce but pourra être atteint en inactivant soit l'enzyme, soit le substrat. Un changement de température ou de pH sera parfois suffisant pour inactiver l'enzyme ; on laissera ensuite diffuser le substrat à l'intérieur du cristal, avant de réactiver l'enzyme par un retour brusque aux conditions initiales. L'inactivation du substrat pourra, dans certains cas, reposer sur l'attachement d'un groupe photolabile : on parle alors de composés-en-cage. Ces composés seront, avant la photoactivation, des inhibiteurs du site actif de l'enzyme. Après illumination cependant, la cage sera relarguée : le substrat ainsi libéré pourra alors s'engager dans un cycle de catalyse.

C/ Echelle de temps : Pour résoudre la structure d'un état intermédiaire de réaction, il faudra que son temps de vie soit supérieur au temps de collecte des données. La plupart des réactions enzymatiques ont des temps caractéristiques de l'ordre de la milli- ou de la micro- seconde ; or les temps de collecte de données, même sur une ligne de synchrotron, sont plutôt de l'ordre

de la minute ou de l'heure. De fait, il faudra soit ralentir la réaction enzymatique, soit accélérer la collecte des données, soit « flash-cooler » le cristal afin de s'affranchir de la durée de vie de l'état intermédiaire. Pour ralentir la réaction enzymatique, les moyens à notre disposition seront avant tout chimiques et biochimiques, et se baseront soit sur des variations de température ou de pH, soit sur l'utilisation d'analogues de substrat, soit sur l'utilisation de mutants de l'enzyme. Cependant la méthode la plus utilisée, car la plus facile à mettre en œuvre, reste la trempe rapide du cristal d'intérêt à température cryogénique, ou « flash-cooling ». En effet le flash-cooling de plusieurs de cristaux, différents laps de temps après l'initiation d'une réaction, peut parfois permettre de reconstituer un cycle catalytique dans son intégralité.

Chapitre IV :

Objectifs de la thèse

IV – Objectifs de la thèse :

L'AChE est une enzyme extrêmement efficace, avec un turn-over compris entre 1000 et 20000 s⁻¹, selon l'espèce considérée (Rosenberry, 1975 ; Quinn, 1987). Étant donnée cette vitesse de catalyse, il est surprenant que son site actif soit situé au fond d'une gorge profonde (20 Å de longueur) et étroite (5 Å à mi-hauteur). Une *respiration moléculaire*, autorisant des mouvements de large amplitude autour de la gorge menant au site actif, semble nécessaire pour que le trafic de substrats et de produits puisse avoir lieu.

Les sites de fixation des substrats et produits au sein de l'AChE n'ont jamais été structuralement caractérisés, de même que les détails de leur trafic dans la gorge de l'enzyme sont inconnus. Très peu d'informations structurales ont été apportées concernant les mouvements moléculaires permettant le déroulement efficace de la catalyse, et seules les simulations par dynamique moléculaire ont à ce jour permis de conforter l'hypothèse de l'existence d'une « backdoor », qui autoriserait le relargage rapide d'un ou des produits d'hydrolyse de l'enzyme. De fait, plusieurs questions sur le fonctionnement de l'AChE sont à ce jour sans réponses ; une contribution structurale pourrait permettre de les dépasser.

Nous allons présenter, dans les pages qui vont suivre, trois approches distinctes de la cristallographie aux rayons X, qui ont rendu possible l'exploration du paysage conformationnel de l'AChE, afin de mieux comprendre le trafic des substrats et produits en son sein.

Avantage fut pris, dans un premier temps, de la faculté d'un ligand à sous sélectionner une conformation particulière de l'enzyme. La résolution de la structure du complexe de l'AChE avec un putatif anti-Alzheimer de seconde génération, le NF595 (Savini *et al.*, 2003), a révélé

une réorganisation majeure du site périphérique de l'enzyme (Colletier *et al.*, 2006a). Ce site étant responsable, au cours du développement de la maladie d'Alzheimer, de la promotion de la formation des plaques amyloïdes (Inestrosa *et al.*, 1996), l'induction de sa déstructuration pourrait avoir un effet clinique bénéfique.

Nous avons, ensuite, voulu suivre structuralement le trafic des substrats et produits au sein de la TcAChE. La résolution de la structure de son complexe avec un analogue de substrat non-hydrolysable, le 4-oxo-*N,N,N*-triméthylpentanaminium, a permis la caractérisation de la structure pré-productive de l'enzyme, *i.e.* celle formée juste avant que la première étape de la catalyse ne procède. Par ailleurs, des trempages de cristaux à différentes concentrations de substrat (acétylthiocholine, ATCh), ont permis d'accumuler, et donc de caractériser structuralement, deux complexes enzyme-substrat-produit différents. Prises conjointement, ces structures permettent une description détaillée du trafic des substrats et produits au sein de l'AChE. Elles révèlent, par ailleurs, les bases moléculaires du phénomène d'inhibition par le substrat (Colletier *et al.*, 2006b).

Enfin, pour tenter d'élucider par quel chemin la choline est expulsée du site actif de l'AChE, nous avons développé une stratégie nouvelle en cristallographie cinétique des protéines. Celle-ci combine l'utilisation d'un précurseur photosensible de la choline (Peng *et al.*, 1996 ; Peng & Goeldner, 1998 ; Peng *et al.*, 1998), qui sera complexé à l'enzyme cristalline (Specht *et al.*, 2001), sa photolyse *in-crystallo* par le biais d'un laser, et l'application d'un profil de température adéquat afin de permettre la survenue des mouvements moléculaires nécessaires à l'expulsion des produits de photolyse. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la sortie de la choline s'accompagne par un éloignement, l'un par rapport à l'autre, des deux domaines de l'enzyme trouvés de part et d'autre de la gorge menant au site actif. Ces mouvements

« globaux » se traduisent, *in-fine*, par une augmentation du volume de la gorge, permettant de visualiser, pour la première fois, l'occurrence d'une respiration moléculaire au sein de l'AChE. Pour autant, aucune porte de sortie annexe à la gorge, perméable ne serait-ce qu'à une molécule d'eau, n'a été visualisée, suggérant fortement que l'ouverture d'une « backdoor », dans la paroi de cette gorge, ne soit pas nécessaire pour autoriser la sortie de la choline (Colletier *et al.*, 2006c - manuscrit en préparation).

Les informations obtenues au cours de cette thèse sont rédigées et présentées sous la forme de trois articles en anglais (Colletier & Weik, 2006a,b,c), puis résumées sous la forme d'un article en français (Colletier & Weik, 2006d). Une courte discussion suivra, dans laquelle seront présentées les perspectives de cette thèse.

Chapitre V :
Matériels et méthodes

V – Matériels et Méthodes :

Afin de rendre plus simple et plus fluide la lecture des résultats de cette thèse, nous allons, dans cette section, décrire en détails les matériels et méthodes utilisés pour chacun des différents projets.

V-1 – Structure de l'AChE en complexe avec un anti-Alzheimer potentiel, le NF595 :

V-1.1 – Matériel chimique

Le NF595 a été synthétisé comme précédemment décrit (Savini *et al.*, 2003) par le laboratoire du Docteur Guiseppe Campiani, à Sienne (Universita' degli Studi di Siena), et nous a été confié par les soins du Docteur Florian Nachon, du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA), à la Tronche.

V-1.2 – Cristallisation de la TcAChE

La TcAChE a été purifiée, comme précédemment décrit (Sussman *et al.*, 1988 ; Raves, 1998), dans le laboratoire du Pr. I. Silman (DN, WIS, Rehovot, Israël). Des cristaux trigonaux (groupe d'espace $P3_121$) ou orthorhombiques (groupe d'espace $P2_12_12_1$ – 2 formes cristallines différentes) de TcAChE ont pu être obtenus grâce à la méthode des gouttes suspendues (McPherson, 1976). La TcAChE cristallise, à 4°C, en présence de 30-34% polyéthylène glycol (PEG) 200, 0.15 M acide morpholino-sulfonique (MES), pH 5.8-6.2. La solution stock de TcAChE est généralement concentrée à 11.5 mg/ml et contient 100mM de chlorure de sodium (NaCl). La procédure de cristallisation est la suivante : le puit est rempli de 500 μ l

d'une solution de liqueur mère ; sur une lamelle, on dépose 1.5 μ l de cette solution et 1.5 μ l de la solution de protéine, formant ainsi la goutte ; cette goutte est ensuite mise à équilibrer en regard du puit ; les cristaux apparaissent au bout d'environ trois semaines.

Quant de trop petits cristaux sont obtenus, ceux-ci peuvent être utilisés pour micro-ensemencer d'autres gouttes ; ils sont alors broyés avec une aiguille d'acupuncture, puis dissouts 100 fois dans une solution 3 fois moins concentrée en l'espèce tampon que la liqueur mère (*i.e.* 30-34% PEG 200, 0.05 M MES, pH 5.8-6.2). Une moustache de chat est alors délicatement trempée dans la solution diluée de broyats cristallins, puis dans la goutte à ensemencer ; cette procédure est répétée pour chaque goutte. Le plus souvent, le micro-encementement sera fructueux ; cela étant, nous recommandons de diminuer la concentration en PEG 200 dans les solutions de puits, afin d'éviter la réapparition de petits cristaux dans les gouttes ensemencées.

V-1.3 – Procédures de trempage

Les cristaux de *TcAChE* furent trempés, à 4°C, dans une solution de liqueur-mère (150mM MES – pH 6 – 32% PEG200) contenant 2 mM de NF595 (12 heures de trempage dans un volume de 5 μ l) .

V-1.4 – Collecte de données cristallographiques

Étant données les propriétés cryo-protectrices du PEG200, les cristaux purent tous être directement « flash-coolés » dans le flux d'azote gazeux à 100K. Les données de diffraction aux rayons X ont été collectées à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), sur la

ligne ID14-EH2. Les données furent indexées, intégrées et mises à l'échelle grâce à la suite de logiciels XDS/XSCALE/XDSCONV (X-ray Detector Software – Kabsch, 1993). Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006a », page 97.

V-1.5 – Résolution des structures et affinements

La structure native de la *TcAChE* dans le groupe d'espace trigonal (code d'accès PDB : 1EA5), sans molécules d'eau ni carbohydrates, fut utilisée comme point de départ pour l'affinement par corps rigide. Subséquemment, la protéine subit un recuit simulé à 7500 K, avec des pas de refroidissement de 10 K, suivi de 250 cycles de minimisation par gradients conjugués. Les données entre 20 et 2.2 Å furent utilisées pour l'affinement dans l'espace réciproque et la production des cartes de densité électronique. Toutes les opérations graphiques dans l'espace réel, et typiquement la reconstruction du modèle, furent réalisées en utilisant soit TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989), soit COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Toutes les étapes de reconstruction manuelle furent suivies d'une minimisation d'énergie et d'un affinement individuel des facteurs B, en utilisant la version 1.1 de CNS (Crystallography and NMR System – Brünger *et al.*, 1998). La validité et la qualité de la structure finale fut évaluée en utilisant le programme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) de la suite CCP4. Les figures dans « Colletier *et al.*, 2006a » furent générées en utilisant PyMOL (DeLano, 2002) et ChemDRAW. Les fichiers de paramètres et de topologies du NF595 furent générés sur le serveur PRODRG (Schuettelkopf & van Aalten, 2004) de l'Université de Dundee (Ecosse, Grande Bretagne).

V-2 – Etude du trafic des substrat et produits au sein de l'AChE :

V-2.1 – Matériel chimique :

Le chlorure (structures cristallographiques) et l'iodure (cinétique enzymatique) d'acétylthiocholine (ATCh) ont été commandés chez Sigma (St. Louis, MO, USA). La thiocholine (TCh) a été obtenue par hydrolyse chimique du chlorure d'acétylthiocholine, à pH12. L'analogue non-hydrolysable de l'acétylcholine (ACh), l'iodure de 4-oxo-*N,N,N*-triméthylpentanaminium (OTMA), a été synthétisé dans le laboratoire du Pr. D. Fournier (GBP, IPBS, Toulouse, France), selon la méthode décrite par Thanei-Wyss & Waser (1989).

V-2.2 – Cinétique d'hydrolyse de l'ATCh

L'hydrolyse de l'ATCh par la *TcAChE* a été mesurée spectrophotométriquement à 412 nm, par la méthode d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961), à 25°C, dans un tampon sodium-phosphate 25 mM, pH 7.0. Cinquante concentrations de substrat entre 4 µM et 200 mM ont été testées, avec un minimum de dix répétitions par concentration. L'activité a été mesurée pendant une minute, après l'addition de l'enzyme à la cuve contenant le mélange substrat / réactif d'Ellman / tampon sodium-phosphate 25mM – pH7. L'hydrolyse spontanée de l'ATCh à pH7 a été soustraite aux valeurs d'activité. Les données ont été ajustées par régression non-linéaire multiple, en utilisant l'équation correspondant au modèle cinétique décrit dans Stojan *et al.*, 2004, et le logiciel GOSA (www.bio-log.biz). Pour plus de détails, voir la publication Stojan *et al.*, 2004, jointe en annexe.

V-2.3 – Cristallisation de la TcAChE

Voir section V-1.2.

V-2.4 – Procédures de trempage

Les cristaux de TcAChE furent trempés, à 4°C, dans une solution de liqueur-mère à pH 6, contenant i/ 0.5 mM d'OMTA (24 heures de trempage dans un volume de 5 µl) ; ii/ 20 mM TCh (12 heures de trempage dans un volume de 5 µl) ; iii/ 500 mM ATCh (40 minutes de trempage dans un volume de 1500 µl) ; iv/ 20 mM ATCh (10 x 60 minutes de trempage dans un volume de 200 µl). Dans ce dernier cas, les cristaux furent transférés toutes les heures dans des solutions fraîches d'ATCh à 20 mM, et une dernière fois, 10 minutes avant la collecte de données.

V-2.5 – Collecte de données cristallographiques

Étant données les propriétés cryo-protectrices du PEG200, les cristaux purent tous être directement « flash-coolés » dans le flux d'azote gazeux à 100K. Les données de diffraction aux rayons X ont été collectées à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), sur les lignes de lumière BM30A, ID14-EH2 et ID29. Les données furent indexées, intégrées et mises à l'échelle grâce à la suite de logiciels XDS/XSCALE/XDSCONV. Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006b », page 126.

V-2.6 – Résolution des structures et affinements

La structure native de la TcAChE (code d'accès PDB : 1EA5), sans molécules d'eau ni carbohydrates, fut utilisée comme point de départ pour l'affinement par corps rigide des quatre structures. Subséquemment, elles subirent un recuit simulé à 7500 K, avec des pas de 10 K, suivi de 250 cycles de minimisation par gradients conjugués. Chacune fut ensuite individuellement affinée, utilisant pour ce faire les données entre 20 Å et la limite de haute résolution. Toutes les opérations graphiques dans l'espace réel, et typiquement la reconstruction du modèle, furent réalisées en utilisant soit TURBO-FRODO, soit COOT. Les cartes de densité électronique furent calculées en utilisant toutes les données entre 15 Å et la limite de haute résolution. Toutes les étapes de reconstruction manuelle furent suivies d'une minimisation d'énergie et d'un affinement individuel des facteurs B, en utilisant soit la version 1.1 de CNS, soit le programme REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project 4 – CCP4, 1994). La validité et la qualité des structures finales furent évaluées en utilisant le programme PROCHECK de la suite CCP4. Au regard de tous ses critères, nos quatre structures furent jugées valables et estimées meilleures que la moyenne des structures de même résolution. Il faut noter que dans tous ces complexes, la sérine catalytique (Ser200) est hors des régions permises du « Ramachandran plot », ce qui avait déjà été observé dans la structure native ; dans le cas du complexe avec la TCh, néanmoins, ce résidu est en double conformation, l'une étant comprise dans les régions permises du Ramachandran, et l'autre non. Plus de détails sur les statistiques de ces quatre structures peuvent être trouvés dans le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006b », page 126. Les figures 2 à 7 dans « Colletier *et al.*, 2006b » furent générées en utilisant PyMOL. Les fichiers de paramètres et de topologies de l'ATCh, de la TCh, de l'OMTA et du PEG200 furent générés sur le serveur PRODRG de l'Université de Dundee (Ecosse, Grande Bretagne).

Dans le complexe *TcAChE*/OTMA, deux molécules d'OTMA purent être ajustées dans la carte de densité différence initiale ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$), au niveau du site périphérique et dans le site actif, respectivement. La densité $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ observée dans le site actif était confondue avec la densité $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ de la sérine catalytique, laquelle s'étendait jusqu'en regard du Trp84. Après ajustement d'une molécule OTMA dans cette densité, il est apparu que le noyau tétraméthylammonium (TMA) pointait vers le Trp84, et que sa portion carbonyle se retrouvait à très courte distance de la sérine catalytique. Afin de déterminer si cette dernière avait engagé une liaison covalente avec l'analogue de substrat, deux modèles furent générés, avec ou sans contrainte de liaison covalente, puis jugés au regard des cartes de densité différence subséquentes. Une liaison covalente (distance : 1.43 Å) pu être modélisée entre l'analogue de substrat et la protéine sans qu'un pic négatif apparaisse dans la carte de densité différence résultante ($\pm 3\sigma$). Par contre, un pic positif fort fut observé dans la carte de densité différence calculée à partir du modèle sans liaison covalente (distance : 2.6 Å). Cette structure est donc celle de l'intermédiaire tétraédrique qui se forme durant la première étape de la catalyse, *i.e.* avant l'acétylation de la protéine.

Pour localiser les molécules d'ATCh ou de TCh dans les complexes de l'AChE avec ces dernières, avantage fut pris du pouvoir diffusif élevé du soufre, en comparaison des autres atomes de la protéine. Les cartes de densité différence initiales furent donc affichées à $\pm 5\sigma$, et les atomes de soufre, positionnés dans les pics de densité encore visibles. Le seul cas où cette procédure fut quelque peu déroutante est celui du complexe avec la TCh : en effet, la densité correspondant au noyau TMA de la molécule de TCh du site actif persistait à un niveau d'affichage plus élevé que celle correspondant à son atome de soufre. Des cartes de différence anormale furent calculées, qui auraient pu renforcer le positionnement de ces

atomes de soufre ; mais aucune ne permit d'observer un signal clair, ni pour les souffres appartenant aux molécules d'ATCh ou de TCh, ni pour ceux de la protéines (résidus Cys et Met). Une de nos préoccupations concerna l'assignation univoque des molécules de substrat ou de produit aux pics de densité différence observés dans les cartes initiales. Pour ce faire, une molécule de TCh fut d'abord introduite dans chacun des pics de densité différence ($\pm 3\sigma$): si après un cycle d'affinement, aucun pic positif significatif n'apparaissait dans la carte de densité différence résultante, cette molécule de produit était conservée. Dans le cas contraire, une molécule d'ATCh était alors introduite ; celle-ci était conservée si aucun pic négatif significatif n'apparaissait, après un cycle d'affinement, dans la carte de densité différence subséquente.

V-3 – Méthodologie en cristallographie cinétique :

V-3.1 – Composés-en-cage

La « choline-en-cage » (CC), *i.e.* l'arsénocholine complexée par un lien covalent photosensible à une cage nitro-phényl-(trifluoro)éthyl (NPE), a été synthétisé comme précédemment décrit (Peng *et al.*, 1996). Plus de détails sur la procédure de synthèse et les propriétés chimiques et spectrophotométriques peuvent être trouvés dans la littérature (Peng *et al.*, 1996 ; Peng & Goeldner, 1998 ; Peng *et al.*, 1998 ; Specht *et al.*, 2001). La constante d'inhibition du CC pour la TcAChE a été estimée à 29 μM (données non montrées). La CC absorbe à 257, 287 et 358 nm, tandis que la cage NPE libre, obtenue après photodissociation sous l'effet d'un flash UV, absorbe à 320 nm. Lorsque les expériences de spectrophotométrie sont réalisées sur la solution mère de CC, ou sur une solution de liqueur mère de cristallisation contenant la CC, des spectres de différence peuvent être utilisés pour suivre soit la disparition de la CC, soit l'apparition de la cage NPE libre, lesquelles rendent proportionnellement compte de la libération de l'arsénocholine. Cependant, lorsque ces expériences sont réalisées sur le complexe TcAChE/CC cristallin, l'absorption de la protéine autour de 280 nm empêche de suivre la disparition de la CC ; de fait, seule l'apparition de la cage libre, observée à 320 nm, renseigne sur la libération de l'arsénocholine.

V-3.2 – Cristallisation de la TcAChE, choix de la forme cristalline et procédures de trempage

Concernant la procédure de cristallisation de la TcAChE, voir la section V-1.2. Les cristaux orthorhombiques de TcAChE poussent sous la forme de plaques fines (typiquement, 150x150x50 μm^3 de volume) tandis que les cristaux trigonaux ont une forme relativement

cubique (typiquement, $150 \times 150 \times 100 \mu\text{m}^3$ de volume). De fait, pour maximiser la transmission de la lumière UV à travers les cristaux de complexes *TcAChE/CC*, la forme orthorhombique a été préférée à la forme trigonale dans les expériences décrites ici. Pour obtenir les complexes *TcAChE/CC* cristallins, les cristaux ont été trempés pendant 12 heures, à l'abri de la lumière, et à 4°C, dans une solution de liqueur mère contenant 5 mM de CC, pH 6.0. Les cristaux furent tous rincés pendant 5 secondes dans une solution de liqueur mère sans CC, avant la trempe rapide à 100K, grâce à un flux d'azote gazeux. Etant données les propriétés cryoprotectrices du PEG 200 à la concentration utilisée pour l'obtention des cristaux, aucune cryoprotection supplémentaire n'a été nécessaire avant la trempe rapide, ou « flash-cooling ». Notre approche de cristallographie cinétique implique l'utilisation d'un laser UV (266 nm – voir figure 2 dans « Colletier et al., 2006c », page 140) pour déclencher, *in-crystallo*, la photodissociation de la CC complexée à la *TcAChE*. L'absorption, par la protéine, du rayonnement UV émis par le laser à 266 nm, réduit l'efficacité globale de la photolyse, puisque seules les couches externes du cristal « voient » effectivement la lumière UV ; de fait, pour toutes les expériences réalisées sur les complexes *TcAChE/CC*, la forme cristalline orthorhombique a été préférée. Cependant, pour adresser la question des dommages d'irradiation induits par les UV, à température ambiante (TA), sur la *TcAChE* native, un cristal trigonal de petite taille ($50 \times 50 \times 30 \mu\text{m}^3$) a été choisi, au travers duquel la transmission des UV a pu être assurée.

V-3.3 – Cryophotolyse et microspectrophotométrie *in-crystallo*

Toutes les caractérisations microspectrophotométriques et expériences préliminaires de ce projet furent réalisées au laboratoire Cryobench (ESRF/IBS – Bourgeois *et al.*, 2002), où un microspectrophotomètre permet d'enregistrer des spectres d'absorption/fluorescence dans le

domaine UV-visible directement sur des cristaux de protéines (voir figure 3 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 142). Cet appareil est composé par : i/ un goniomètre mono-cercle, sur lequel sera installé le cristal ; ii/ trois objectifs identiques et confocaux, servant à appliquer/recevoir la lumière UV-visible sur/à partir du cristal ; iii/ un spectrophotomètre CCD (gamme de longueurs d'onde : 200-850 nm –résolution spectrale : 2.3 nm – Ocean Optics) ; iv/ un microscope (Olympus) connecté à une caméra haute résolution (Olympus), qui permet d'observer et de centrer le cristal ; et v/ un appareil de refroidissement à température cryogénique par vaporisation d'azote liquide, qui permettra en sus d'appliquer des profils de température variables sur le cristal. Deux des objectifs sont alignés pour une transmission, tandis que le troisième, à 90°, est utilisé pour focaliser le laser 266 nm (puissance du laser : 2mW – Nanolase) sur le cristal. Le laser et la lampe Xe/halogène (lampe Micropack Xe/halogène– Ocean Optics) sont connectés aux objectifs d'émission par des fibres de 600 et 100 μm de diamètre (Spectraline), respectivement, tandis qu'une fibre de 200 μm de diamètre est utilisée pour connecter l'objectif de réception au spectrophotomètre. Les spectres sont enregistrés et analysés sur un ordinateur PC, en utilisant le logiciel OIBase32 (Ocean Optics). Plus de détails sur le laboratoire Cryobench peuvent être trouvés dans la publication de référence (Bourgeois *et al.*, 2002) ou sur le site web officiel du Cryobench : <http://www.esrf.fr/UsersAndScience/Experiments/MX/Cryobench/>.

Pour minimiser les expositions à la lumière ambiante, qui auraient entraîné une photolyse faible mais inquantifiable de la CC, le laboratoire Cryobench était éclairé par une lampe à sodium durant toutes les expériences. Les expériences présentées en figures 4a et 4b dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 149, ont été réalisées après trempe rapide à 100 K d'une solution de liqueur mère contenant 5 mM de CC, pH 6.0 (boucle de 400-500 μm de diamètre). La figure 4a montre le spectre d'absorption de la CC à 100K, tandis que la figure 4b montre six spectres de différence obtenus après 60, 120, 180, 240, 300 et 360 secondes d'exposition

au laser 266 nm, à 100 K ; le dernier spectre différence fut obtenu après un recuit de 5 secondes à température ambiante (RTA), sans exposition au laser. Quoique la boucle contenant la solution analysée ait été en rotation durant les expositions au laser, tous les spectres de différences ont été enregistrés en utilisant la même orientation. L'expérience présentée en figure 4c dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 149, a été réalisée sur un cristal orthorhombique de *TcAChE*, trempé pendant 12h, dans l'obscurité et à 4°C, dans une solution de liqueur mère contenant 5 mM de CC, pH 6.0. Le cristal fut rincé pendant 10 secondes dans une solution de liqueur mère sans CC avant d'être monté dans une boucle et subséquemment refroidi, par trempe ultrarapide, dans un flux d'azote gazeux à 100 K. La figure 4c montre les spectres de différence enregistrés à 100 K, à travers le cristal, après 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 et 900 secondes d'exposition au laser 266 nm. Pour maximiser l'efficacité de la photolyse, le cristal fut également mis en rotation durant toutes les expositions au laser, mais tous les spectres ont été enregistrés en utilisant la même orientation. La figure 4d dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 149, montre une estimation de la transmission du rayonnement UV à 266 nm à travers un cristal orthorhombique de *TcAChE*. Les concentrations de l'enzyme cristalline dans les groupes d'espaces orthorhombiques et trigonaux sont de 9.4 et 5.1 mM, respectivement, et les valeurs des coefficients d'extinction molaire des résidus aromatiques à 266 nm peuvent être trouvés sur <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/index.html>. La figure 4 a été produite en utilisant le logiciel PLOT (<http://plot.micw.eu/>).

V-3.4 – Collecte des données cristallographiques

V-3.4.1 : Structure du complexe *TcAChE*/CC non photolysé :

Un cristal orthorhombique de volume $\approx 150 \times 150 \times 50 \text{ }\mu\text{m}^3$ fut monté dans une boucle, puis refroidi, par trempe ultrarapide, dans un flux d'azote gazeux à 100 K. Les données cristallographiques furent collectées sur la ligne BM30A (CRG-FIP) de l'ESRF. Pour minimiser les expositions à la lumière ambiante, la cabine expérimentale fut éclairée par une lampe à sodium durant toute la durée de l'expérience. Les données furent indexées, intégrées et moyennées en utilisant XDS/XSCALE, et les facteurs de structures générés en utilisant XDSCONV. Cette structure est nommée « structure 1 » dans « Colletier *et al.*, 2006c ». Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160.

V-3.4.2 : Recuit à température ambiante (RTA) :

Pour évaluer la gamme de temps accessible pour les procédures de RTA, des expériences préliminaires ont été réalisées sur un diffractomètre de laboratoire (Rigaku R-AXIS IV) en utilisant des cristaux natifs de *TcAChE*. Les cristaux étaient d'abord montés dans une boucle, et refroidis par trempe ultrarapide dans un flux d'azote gazeux à 100 K. Une première image de diffraction était alors collectée, puis des RTA étaient infligés aux cristaux en bloquant le flux d'azote gazeux avec une carte téléphonique pendant 1 à 60 secondes. Après chaque RTA, un autre cliché de diffraction était collecté, et sa limite de résolution comparée à celle du premier jeu de données. Les gammes de temps accessibles pour les procédures de RTA ont ainsi été évaluées à 4-45 secondes, pour les cristaux orthorhombiques de *TcAChE*, et à 7-30 secondes, pour les cristaux trigonaux.

V-3.4.3 : Effet du RTA sur la structure du complexe *TcAChE*/CC non photolysé :

La question de l'effet du RTA sur la structure du complexe *TcAChE*/CC non photolysé a été adressée sur un cristal orthorhombique de volume $\approx 150 \times 150 \times 50 \text{ }\mu\text{m}^3$. Les données furent collectées à l'ESRF, sur la ligne ID14-EH4, dont la cabine expérimentale fut éclairée durant toute la durée de l'expérience par une lampe à sodium. Le cristal fut monté dans une boucle, puis refroidi par trempe ultrarapide dans un flux d'azote gazeux à 100 K. Subséquemment, il subit un RTA de 9 secondes, avant d'être à nouveau refroidi à 100 K pour la collecte de données cristallographiques. Ce jeu de données fut indexé, intégré et moyenné en utilisant XDS/XSCALE, et les facteurs de structure générés grâce à XDSCONV. Cette structure est nommée « structure 2 » dans « Colletier *et al.*, 2006c ». Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160.

V-3.4.4 : Dommages induits par les UV à température ambiante sur la *TcAChE* native :

Puisque notre approche expérimentale implique l'utilisation d'un laser 266 nm pour photodissocier la CC (voir la figure 2 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 140), un contrôle est nécessaire pour distinguer les changements structuraux dus à l'effet des UV à température ambiante, de ceux liés à la sortie des produits de photolyse du site actif de l'enzyme. Un cristal trigonal ($\approx 50 \times 50 \times 30 \text{ }\mu\text{m}^3$) fut monté dans une boucle, puis refroidi par trempe ultrarapide, dans un flux d'azote gazeux à 100 K. L'allumage du laser et le RTA furent synchronisés manuellement. Le cristal fut amené à TA pour 20 secondes, durant lesquelles il fut exposé au laser 266 nm (soit 20 secondes d'exposition), avant d'être à nouveau refroidi à 100 K, où la collecte de données eut alors lieu. Le cristal fut mis en rotation durant toute la durée de l'exposition au laser. Le jeu de données fut indexé, intégré et moyenné en utilisant

XDS/XSCALE, et les facteurs de structure générés en utilisant XDSCONV. Cette structure est nommée « structure 3 » dans « Colletier *et al.*, 2006c ». Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160.

V-3.4.5 : Structure du complexe *TcAChE*/CC photolysé après RTA :

Une représentation schématique de la procédure expérimentale est montrée en figure 2 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 140. Cette expérience a été réalisée sur la ligne ID14-EH4 de l'ESRF ; pour minimiser l'exposition à la lumière ambiante, la cabine expérimentale était éclairée par une lampe à sodium durant toute la durée de l'expérience. Un cristal orthorhombique ($\approx 100 \times 100 \times 30 \mu\text{m}^3$) fut monté dans une boucle, et refroidi par trempe ultrarapide dans un flux d'azote gazeux à 100 K. La photolyse de la CC complexée à la *TcAChE* cristalline fut assurée par un laser à 266 nm connecté, *via* une fibre optique de 600 μm (Spectraline), à un objectif centré sur le cristal (diamètre du spot : 150 μm) (Nanao & Ravelli, 2006; Ravelli, Murray, McGeehan, Cipriani, Theveneau, Weik & Garman, en rédaction). L'allumage du laser et le RTA furent synchronisés manuellement. Le cristal fut amené à TA pour 9 secondes, durant les 5 premières secondes desquelles il fut exposé au faisceau du laser, avant d'être ramené à 100 K pour la collecte de données cristallographiques ; de fait, une relaxation de 4 secondes à température ambiante a été autorisée après l'extinction du laser. Le cristal fut mis en rotation durant toute l'exposition au laser. Le jeu de données fut indexé, intégré et moyenné en utilisant XDS/XSCALE, et les facteurs de structure générés en utilisant XDSCONV. Cette structure est nommée « structure 4 » dans « Colletier *et al.*, 2006c ». Pour plus de détails, voir le tableau 1 dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160.

V-3.5 – Résolution des structures et affinements

V-3.5.1 : Complexes *TcAChE*/CC :

La structure de la *TcAChE* native (sans molécules d'eau ni carbohydrates) dans le groupe d'espace orthorhombique (PDB code : 1W75 – Greenblatt *et al.*, 2004) a été utilisée comme modèle initial pour l'affinement par corps rigide des trois structures des complexes *TcAChE*/CC (structures 1, 2 et 4), en utilisant les données comprises entre 20 et 4 Å de résolution. Subséquemment, les trois structures ont été soumises à 250 cycles de minimisation en gradient conjugué. Les données entre 20 Å et la limite de haute résolution ont été utilisées pour l'affinement dans l'espace réciproque et le calcul de cartes de densités électroniques. Les opérations graphiques dans l'espace réel, dont la reconstruction du modèle, ont été réalisées en utilisant le logiciel COOT. Toutes les étapes de reconstruction manuelle furent suivies d'une minimisation d'énergie et d'un affinement des B-facteurs individuels (structures 1 & 2) ou groupés (structure 4 – pour chaque résidu, un groupe pour les atomes de la chaîne principale et un autre pour ceux de la chaîne latérale ; un groupe pour chaque molécule de CC ou de carbohydrate). L'affinement et le calcul de cartes ont été réalisés en utilisant soit CNS version 1.1, soit les modules REFMAC et FFT de la suite CCP4. Pour calculer les cartes « omit » Fo-Fc de la structure 1, montrées en figure 5 dans « Colletier *et al.*, 2006c », dix cycles de minimisation ont été réalisés après avoir omis les coordonnées des molécules de CC du modèle. Les figures 5 & 6 dans « Colletier *et al.*, 2006c » ont été produites grâce à PyMOL, à l'exception de la figure 6c, qui a été produite par ESCET (Schneider, 2000). Les volumes de la gorge menant au site actif de la *TcAChE* ont été calculés en utilisant CASTp/GPSS (Binkowski *et al.*, 2003), avec une sonde d'un rayon de 1.4 Å (soit la taille d'une molécule d'eau) ; ils sont indiqués dans le tableau II-A dans « Colletier *et al.*, 2006c »,

page 161. Les topologies et paramètres moléculaires des molécules de CC ont été générées en utilisant XPLO2D (Kleywegt, 1995). Les statistiques de l'affinement sont indiquées dans le tableau I dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160. La qualité des structures a été jugée et validée en utilisant PROCHECK.

En ce qui concerne les structures 1 et 2, la localisation des molécules de CC fut relativement aisée, étant donnée la très bonne qualité des cartes de densités électroniques initiales. A chacun des deux monomères (A & B) de l'unité asymétrique, deux molécules de CC ont été assignées avec une occupation de 1, dans le site actif et au niveau du site périphérique, respectivement. L'orientation des molécules de CC a été sur-facilitée par le fort signal anomal de l'atome d'As de la portion arsénocholine (pic anomaux supérieurs à 17σ dans les structures 1 & 2). Des cartes « omit » $2F_o-F_c$ composites ont été calculées pour chacune des deux structures, à partir desquelles la première étape de reconstruction manuelle a été réalisée. Les atomes qui ne présentaient pas de densité électronique à 1σ dans ces cartes ont été retirés du modèle ; ils n'y furent réintégrés que si des pics positifs supérieurs à 3σ apparaissaient dans les cartes F_o-F_c subséquentes.

L'affinement fut moins trivial dans le cas de la structure 4, du fait de la moins bonne qualité des cartes de densité électronique initiales et de l'absence d'un signal anomal significatif (hauteur de pic maximum : 4.2σ). Une carte de différence $F_o^4-F_o^2$, calculée en utilisant les phases dérivées du modèle de la structure 2, a affiché des pics négatifs forts sur les atomes d'As des molécules de CC, dans le site actif et au niveau du site périphérique de chacun des deux monomères de l'unité asymétrique. Pour estimer l'occupation des molécules de CC après photolyse et RTA, les coordonnées des molécules de CC dans la structure 2 ont été insérées dans le modèle de la structure 4, avec une occupation de 1, et une carte F_o-F_c a été

calculée après minimisation d'énergie et affinement de B-facteurs groupés. Cette carte a affiché des pics négatifs forts sur la cage NPE et la portion arsénocholine des molécules de CC, au niveau du site périphérique et dans le site actif des deux monomères de l'unité asymétrique. De plus, les B-facteurs des molécules de CC ont doublés par rapport à leur valeurs initiales. Pour cette raison, les B-facteurs des molécules de CC ont par la suite été restreints à une valeur de 30 % supérieure à celle des résidus les plus proches, *i.e.* le Trp84, dans le site actif, et le Trp279, au niveau du site périphérique ; les occupations des molécules de CC ont alors été diminuées graduellement jusqu'à ce qu'aucun pic négatif ne subsiste dans la carte Fo-Fc subséquente. Ainsi, les occupations des molécules de CC ont été réduites à 0.5, pour les quatre molécules dans l'unité asymétrique. Enfin, une carte « omit » 2Fo-Fc composite a été calculée, à partir de laquelle la première étape de reconstruction manuelle a été réalisée. Les atomes qui ne présentaient pas de densité électronique à 1σ dans cette carte ont été retirés du modèle, et n'y furent réintégrés que si des pics positifs supérieurs à 3σ apparaissaient dans les cartes Fo-Fc subséquentes.

V-3.5.2 : TcAChE native endommagée par les UV :

La structure de la TcAChE native (sans molécules d'eau ni de carbohydrates) dans le groupe d'espace trigonal (PDB code : 1EA5 – Sussman *et al.*, 1991) a été utilisé comme modèle initial pour l'affinement par corps rigide, en utilisant les données comprises entre 20 et 4 Å. 250 cycles de minimisation d'énergie ont ensuite été subis par la structure. Les données entre 20 Å et la limite de haute résolution ont été utilisées pour l'affinement dans l'espace réciproque et le calcul des cartes de densités électroniques. Malgré la résolution limitée des données, une carte de densité électronique initiale de bonne qualité fut obtenue. Quelques ajustements du modèle, quoique mineurs, ont été nécessaires ; ils furent réalisés en utilisant le

programme COOT. Chaque étape de reconstruction manuelle a été suivie par une minimisation d'énergie et un affinement de B-facteurs groupés (pour chaque résidu, un groupe pour les atomes de la chaîne principale et un autre pour ceux de la chaîne latérale ; un groupe pour chaque molécule de carbohydrate). L'affinement dans l'espace réciproque et le calcul des cartes de densité électronique ont été réalisés en utilisant CNS version 1.1. Les statistiques de l'affinement sont indiquées dans le tableau I dans « Colletier *et al.*, 2006c », page 160. La qualité de la structure fut jugée et validée par PROCHECK. L'effet, sur la TcAChE native, d'une exposition de 20 secondes au laser 266 nm à TA, fut évalué en calculant une « error-scaled difference distance matrix » (Schneider, 2000) entre la structure 3 et la structure affinée à partir d'un cristal ayant été amené à TA, pour 20 secondes, sans exposition au laser 266 nm (structure N – données non montrées). Les volumes de la gorge menant au site actif de la TcAChE, dans la structure 3 et la structure N, ont été calculés en utilisant CASTp/GPSS ; ils sont indiqués dans le tableau II-B de « Colletier *et al.*, 2006c », page 161.

Chapitre VI :

Résultats

VI – Résultats :

VI-1 – Conformational Flexibility in the Peripheral Site of Torpedo californica Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor

VI-2 – Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase

VI-3 – Kinetic crystallography on acetylcholinesterase

VI-4 – Exploration structurale du paysage conformationnel de l'acétylcholinestérase par cristallographie cinétique

Conformational Flexibility in the Peripheral Site of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor.

Jacques-Philippe Colletier¹, Benoît Sanson¹, Florian Nachon², Emanuele Gabellieri^{3,4},
Caterina Fattorusso^{4,5}, Giuseppe Campiani^{3,4}, Martin Weik¹

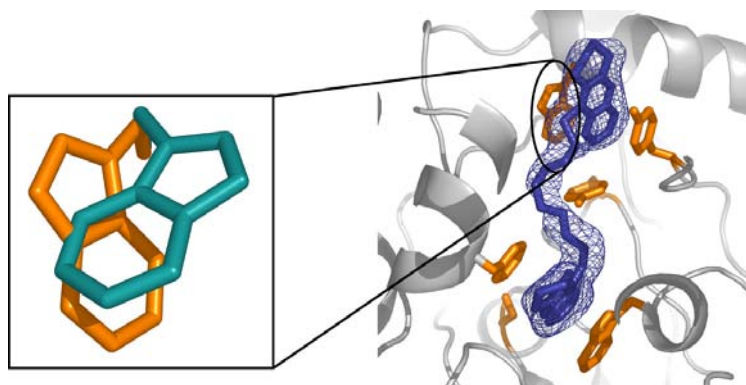
¹Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France

²Unité d'Enzymologie, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, BP87-38702 La Tronche, France,

³Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, via Aldo Moro, Università di Siena, 53100 Siena, Italy,

⁴European Research Centre for Drug Discovery and Development, University of Siena, Italy,

⁵Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli Federico II, via D. Montesano 49, 80131 Napoli, Italy.



Colletier *et al.*, (2006a) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4526-4527.

Structural data :

The coordinates and structure factor amplitudes of the complex structures of *TcAChE* with NF59 have been deposited in the Protein Data Bank under accession code 2CEK.

Abstract :

The X-ray crystallographic structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase (*TcAChE*) in complex with the bifunctional inhibitor NF595, a potentially new anti-Alzheimer drug, has been solved. For the first time in *TcAChE*, a major conformational change in the peripheral-site tryptophan residue is observed upon complexation. The observed conformational flexibility highlights the dynamic nature of protein structures and is of importance for structure-based drug design.

Communication :

X-ray crystallography is a powerful tool that provides time-averaged pictures of biological macromolecules. These seemingly static structures are in reality animated by molecular motions stemming from transitions between substates in a conformational energy landscape (Frauenfelder *et al.*, 1991). This landscape is characterized by a very large number of conformational substates, the population of which depends on their free energy. A crystallographic structure represents only the predominant substate of a molecule and minor populations can usually not be assessed. Yet, the understanding of biological function on a molecular level requires knowledge about both structural and dynamical aspects of e.g. an enzyme. This is particularly obvious for acetylcholinesterase (AChE), the active site of which is accessed by a deep and narrow gorge (Sussman *et al.*, 1991) that makes ‘breathing’ motions essential for traffic of substrates and products to occur (Shen *et al.*, 2002). Here, we report the X-ray crystallographic structure of AChE from *Torpedo californica* (*TcAChE*) in complex with a gorge-spanning inhibitor, NF595 (Figure 1). NF595 has been synthesised with a view

to developing a new generation of anti-Alzheimer drugs, interacting with both the active and peripheral binding sites of AChEs (Savini *et al.*, 2003). Surprisingly, and for the first time in *TcAChE*, a major conformational change is observed upon complexation in the peripheral substrate-binding site. We suggest that this conformational substate is part of the equilibrium dynamics of the native enzyme and that it has been selected by inhibitor-binding.

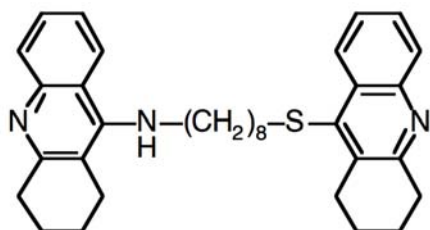


Figure 1. Structure of NF595 (referred to as compound 3h in Savini *et al.*, 2003). The heterodimer bears a tacrine moiety and a sulphur-containing tetrahydroacridine system connected by a 8-methylene linker.

AChE is one of nature's fastest enzymes. Essential in the process of signal transmission in cholinergic synapses, AChE is responsible for the breakdown of the neurotransmitter acetylcholine into acetate and choline (Silman & Susman, 2005). It is the target of all currently approved anti-Alzheimer drugs, of insecticides and of chemical warfare agents. The first structure of an AChE revealed the buried nature of the active site and a peripheral substrate-binding site at the entrance of the gorge near the enzyme's surface (Figure 2a – Sussman *et al.*, 1991). Numerous structures of *TcAChE* in complex with various inhibitors have been solved providing insights into inhibitor-induced conformational changes (Shen *et al.*, 2002). The conformation of the active-site gorge appears to be highly conserved and the observed structural changes are small, except for those of Phe330.

Trigonal crystals of *TcAChE* (Sussman *et al.*, 1991) were soaked into the mother liquor solution containing 2 mM NF595, loop-mounted and flash-cooled at 100 K, and diffraction data were collected on beamline ID14-EH2 at the European Synchrotron Radiation Facility. Structure refinement to a resolution of 2.2 Å included rigid body refinement, simulated

annealing, energy minimization and individual B-factor refinement (PDB accession code 2CEK).

NF595 spans the gorge, in agreement with previous docking studies (Savini *et al.*, 2003), and binds at the peripheral and the active sites (Figure 2b). Both heteroaromatic moieties are engaged in π - π stacking interactions with two aromatic residues, *i.e.* with Trp84 and Phe330 in the lower part of the gorge, and with Trp279 and Tyr70 at the peripheral site. In order to make this parallel stacking mode possible, the side chains of both Phe330 and Trp279 rotate by about 90 degree with respect to their native positions. Whereas Phe330 is known to be a mobile residue, the conformational change of Trp279 has never been observed before in *TcAChE*.

Bourne and collaborators recently determined the structure of mouse AChE (mAChE) in complex with a bifunctional inhibitor (syn1 TZ2PA6) formed by in situ click chemistry (Bourne *et al.*, 2004). This complex also revealed a 90 degree rotation of the mAChE Trp286, equivalent to *TcAChE* Trp279, the key constituent of AChEs peripheral site. In the mAChE complex, Trp286 reorients in such a way that it is exposed to the solvent, whereas in the *TcAChE* complex, Trp279 draws back towards the inside of the gorge. The two inhibitor-induced conformations of the peripheral-site tryptophan residues are thus 180 degree apart (Figure 2c). This conformational difference might either be due to the different inhibitors used, or to the different packing patterns in crystals of *TcAChE* and mAChE. The peripheral-site architecture in AChEs from different species, including mAChE, *TcAChE* and human AChE, is structurally conserved. Therefore, the inhibitor-induced conformations of Trp279 in *TcAChE* and of Trp286 in mAChE are most probably part of a common energy landscape. They illustrate the wide range of conformations accessible to a functionally-important residue. A smaller movement of Trp279 has also been observed in the crystal structure of *TcAChE* in

complex with DFP, in which a loop comprising this residue undergoes a conformational change (Millard *et al.*, 1999b).

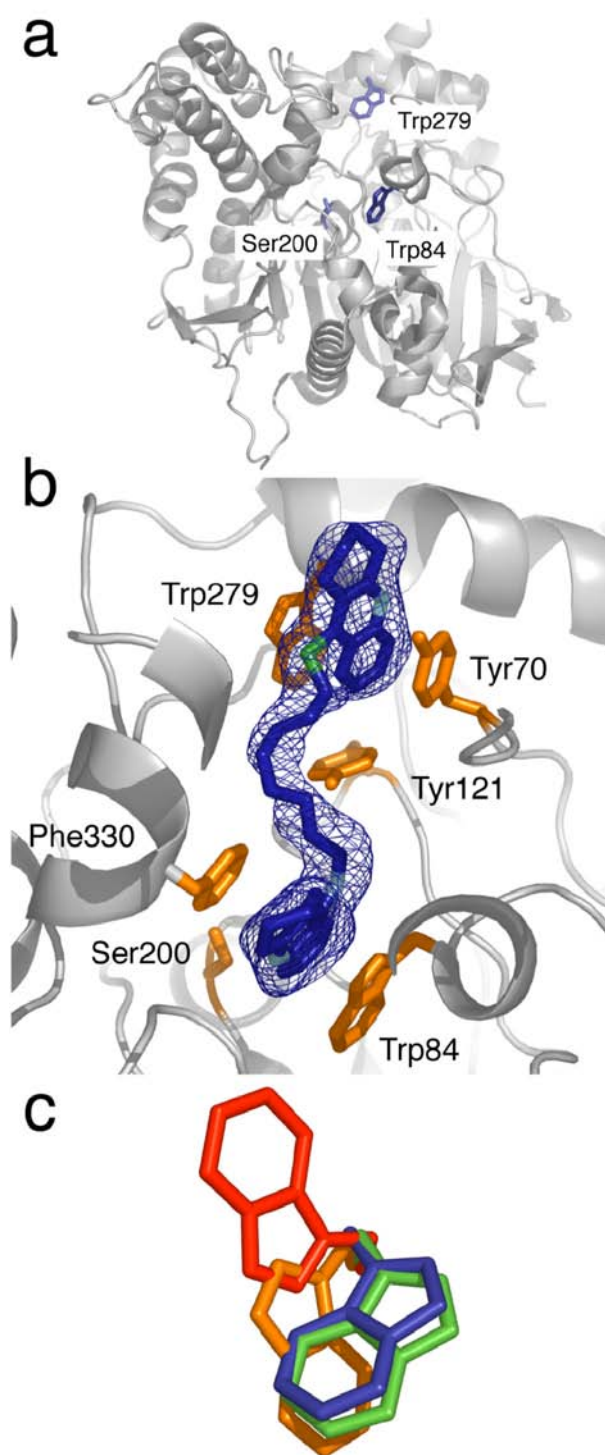


Figure 2. (a) 3D structure of native *TcAChE* (pdb access code 1EA5), highlighting the catalytic Ser200 and Trp84 in the active and Trp279 at the peripheral substrate binding site.

Figure 2. (b) The bifunctional inhibitor NF595 (S: green, N: light-blue, C: dark-blue) spans the gorge of *TcAChE*. Its orientation was identified with the help of the strongly diffracting sulphur atom. Phe330 is present in two alternate conformations. Only the one close to NF595 is shown. The simulated-annealing omit map is contoured at 4.5 σ .

Figure 2. (c) Conformational plasticity in the peripheral-site tryptophan (Trp279 of *TcAChE* in the native (blue) and the NF595-bound (orange) structure and Trp2866 of mAChE in the native (green) and an inhibitor-bound (red) structure. The χ values for the peripheral-site Trp side chains are: $\chi_1=-61^\circ$, $\chi_2=92^\circ$ (Trp279 native), $\chi_1=-116^\circ$, $\chi_2=-132^\circ$ (Trp279 NF595), $\chi_1=-60^\circ$, $\chi_2=90^\circ$ (Trp286 native) and $\chi_1=-162^\circ$, $\chi_2=52^\circ$ (Trp286 syn1 TZ2PA6). Panels a-c show the enzyme in very similar, yet not exactly identical orientations.

The AChE peripheral site has been shown to promote the growth and maturation of β -amyloid plates (Inestrosa *et al.*, 1996), a process that is thought of being at the origin of neurodegeneration associated with Alzheimer disease. The observed mobility of the peripheral site should be of importance in the elaboration of models that aim at addressing the structural interaction between AChE and β -amyloid structures.

The observation of conformational flexibility of the peripheral-site tryptophan, of Phe330 (Kryger *et al.*, 1999), of the catalytic His440 (Millard *et al.*, 1999b), and of parts of the enzyme's wall near the acyl-binding pocket (Greenblatt *et al.*, 2004) draws a dynamic picture of the gorge and the active site in *TcAChE*. Indeed, a delicate balance between rigidity and flexibility might resolve the apparent paradox between AChE catalytic efficiency and the reduced accessibility of its active site.

We suggest that the NF595 inhibitor selects a minor, yet already existing conformation of the complex energy landscape of the native enzyme. Indeed, experimental (Eisenmesser *et al.*, 2005) and computational (Tobi & Bahar, 2005) evidence indicates that motions required for ligand binding or catalysis are already existing in the equilibrium dynamics of the native state of enzymes. Whether or not this holds true for Trp279, could be addressed by molecular dynamics simulations. The observed plasticity of functionally-relevant structural elements is of importance for structure-based drug-design. Indeed, in the quest for tailor-made drugs, an enzyme should not be considered only as a rigid template, but conformational heterogeneity should be taken into account as well (Greenblatt *et al.*, 2004). In this context, X-ray crystallography is a powerful tool that can address both structural and dynamical aspects of biological macromolecules.

Supporting Information Available:

A movie, showing structural changes in the gorge upon binding of NF595, and X-ray data processing and structure refinement statistics. This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

X-ray data processing and structure refinement statistics :

	<i>TcAChE</i> in complex with NF595
X-Ray source	ESRF
Beamline	ID14-EH2
Temperature (K)	100
Oscillation range	1°
Number of frames	80
Exposure time (sec/frame)	3 unatt. beam
Space-group	P3 ₁ 21
Wavelength (Å)	0.932
Unit cell parameters (Å)	
a=b	111.94
c	137.12
Resolution range (Å) ⁽¹⁾	20.00 - 2.20 (2.33 - 2.20) ^(*)
Completeness (%)	99.9 (100)
R _{merge} (%)	6.5 (38.6)
I/σI	16.18 (3.36)
Unique Reflections	50867
Redundancy	4.92
Observations/parameters ratio	2.63
R _{cryst.} (%) ⁽²⁾	17.9 (27.8)
R _{free} (%)	20.9 (31.5)
r.m.s.d. bond length (Å)	0.006
r.m.s.d. bond angles (°)	1.3
r.m.s.d between native (1EA5) and NF595 complex (2CEK) structure (Å)	0.282
Wilson B factor (Å ²)	27.1
Average B factors (Å ²)	43.5
Protein (Trp279)	42.95 (45.34)
Carbohydrate	67.03
Water	55.74
Ligands (NF595)	78.16 (56.70)

(*) Values in brackets are for the highest resolution shells.

⁽¹⁾ Data were indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE and structure factor amplitudes generated using XDSCONV (Kabsch, 1993).

⁽²⁾ The native structure of *TcAChE* (PDB entry code 1EA5), without water and sugar molecules, was used as a starting model for the rigid body refinement in the resolution range of 20-4 Å. Subsequently, it underwent simulated annealing to 7500 K, with cooling steps of 10 K, followed by 250 steps of conjugate-gradient minimization. Diffraction data in the resolution range of 20-2.2 Å were used for refinement and map calculations. Graphic operations and model building were performed with TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989). Energy minimization and individual B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinements and map calculations were performed using CNS version 1.1 (Brünger *et al.*, 1998). The quality of the refined structure was assessed using PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Parameters and topology of NF595 were generated using the PRODRG server of Dundee University (Schuettelkopf & van Aalten, 2004). Figure 2 was generated using PYMOL version 0.99 (DeLano, 2002).

Acknowledgment :

We are grateful to Lilly Toker, Joel Sussman and Israel Silman for providing us with purified *TcAChE* and for a fruitful long-term collaboration, and to Martin Blackledge and Giuseppe Zaccai for critically reading the manuscript. We thank the ESRF staff for help during data collection. Financial support by the CEA to JPC and MW is gratefully acknowledged.

Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase

Jacques-Philippe Colletier¹, Didier Fournier², Harry M. Greenblatt³, Jure Stojan⁵, Joel L.

Sussman³, Giuseppe Zaccai^{1,6}, Israel Silman⁴ and Martin Weik¹

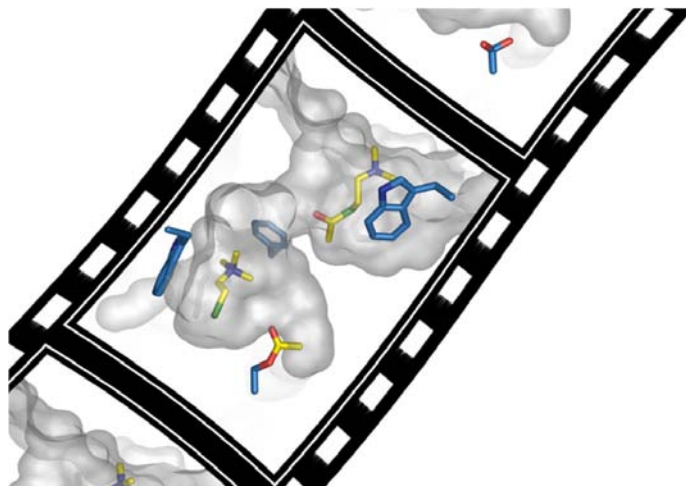
¹Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS/UJF),
41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

²Groupe de Biotechnologie des Protéines, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale
(CNRS/UPS), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

Departments of Structural Biology³ and Neurobiology⁴, Weizmann Institute of Science, 76100
Rehovot, Israel

⁵Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

⁶Institut Laue-Langevin, 6 rue Jules Horowitz, BP 156, 38042 Grenoble Cedex 9, France



Colletier *et al.*, (2006b) *EMBO J.*, under press.

Structural data

The coordinates and structure factor amplitudes of the complex structures of *TcAChE* with the substrate analogue OTMA, the product thiocholine, and the substrate acetylthiocholine at 20 mM and 500 mM, have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 2c5f, 2c5g, 2c58 and 2c4h, respectively.

Abstract

Acetylcholinesterase terminates nerve-impulse transmission at cholinergic synapses by rapid hydrolysis of the neurotransmitter, acetylcholine. Substrate traffic in acetylcholinesterase involves at least two binding sites, the catalytic and peripheral anionic sites, which have been suggested to be allosterically related and involved in substrate inhibition. Here we present the crystal structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with the substrate acetylthiocholine, the product thiocholine and a non-hydrolysable substrate analogue. These structures provide a series of static snapshots of the substrate *en route* to the active site and identify, for the first time, binding of substrate and product at both the peripheral and active sites. Furthermore, they provide structural insight into substrate inhibition in acetylcholinesterase at two different substrate concentrations. Our structural data indicate that substrate inhibition at moderate substrate concentration is due to choline exit being hindered by a substrate molecule bound at the peripheral site. At the higher concentration, substrate inhibition arises from prevention of exit of acetate due to binding of two substrate molecules within the active-site gorge.

Introduction

The principal role of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is termination of impulse transmission at cholinergic synapses by rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh; Rosenberry, 1975). In a first step, the enzyme is acetylated and the choline product expelled. A water molecule then regenerates the free enzyme with concomitant release of acetic acid. As required by its biological function, AChE is a very efficient enzyme, with a turnover of 10^3 - 10^4 sec⁻¹, operating at a speed near the diffusion limit (reviewed by Quinn, 1987; Silman and Sussman, 2005). AChE is the target of nerve agents (Millard *et al.*, 1999a), anti-Alzheimer drugs (reviewed by Greenblatt *et al.*, 2003), and insecticides (Smissaert, 1964), and indeed has been incorporated into biosensors for both insecticides and nerve agents (Marty *et al.*, 1992). An understanding of its mode of action thus goes beyond academic interest.

Solution of the crystal structure of *Torpedo californica* (Tc) AChE (Sussman *et al.*, 1991) revealed, unexpectedly, that its active site is buried at the bottom of a narrow gorge, about 20 Å deep, lined with conserved aromatic residues (Fig. 1). This raised cogent questions as to how traffic of substrates and products, to and from the active site, can occur so rapidly. The active-site gorge is only ~5 Å wide at a bottleneck formed by the van der Waals surfaces of Tyr121 and Phe330 (residue numbers refer to the TcAChE sequence throughout the manuscript unless stated otherwise). Since the diameter of the quaternary moiety of choline is 6.4 Å, substantial breathing motions of gorge residues are required for traffic of substrates and products to occur.

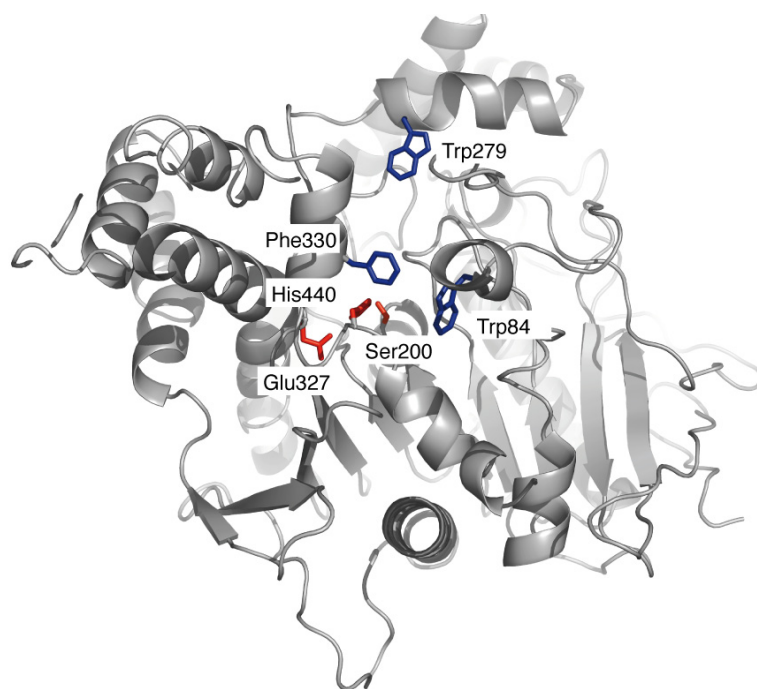


Fig. 1: 3D structure of native *TcAChE* (pdb access code 1EA5), highlighting the catalytic triad in red, Trp84 in the CAS, Trp279 at the PAS, and the bottleneck residue Phe330 in blue.

Rather than displaying Michaelis-Menten kinetics, AChE is inhibited at high substrate concentrations (Alles and Hawes, 1940; Marcel *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2003). Like butyrylcholinesterase (BChE) (Eriksson and Augustinsson, 1979; Masson *et al.*, 1996), a structurally homologous enzyme (Nicolet *et al.*, 2003), certain AChE species can be activated at low substrate concentrations (Brochier *et al.*, 2001; Marcel *et al.*, 1998). All current kinetic models for AChE propose the existence of at least two substrate-binding sites, the active site, near the bottom of the active-site gorge, and the peripheral anionic site (PAS), near its entrance. Binding of ligands at the PAS affects catalytic activity (Bergmann *et al.*, 1950; Changeux, 1966; Belleau *et al.*, 1970; Roufogalis and Quist, 1972; Taylor and Lappi, 1975). The active site is composed of two sub-sites. In the catalytic anionic subsite (CAS), it has been proposed that the choline moiety of ACh is stabilized principally *via* a cation- π interaction with Trp84, but also interacts with Glu199 and Phe330 (Sussman *et al.*, 1991). A similar cation- π interaction occurs in human BChE (HuBChE), where Trp82 interacts with the product choline and the substrate butyrylthiocholine (Nicolet *et al.*, 2003). The esteratic

subsite in *TcAChE* contains a typical serine-hydrolase catalytic triad, Ser200-His440-Glu327. A substantial contribution to ACh binding within the active site also arises from stabilization of the carbonyl oxygen within the oxyanion hole, Gly118, Gly119, and Ala201, and of the acetyl group in the "acyl-pocket", Trp233, Phe288, Phe290, and Phe331 (Harel *et al.*, 1996). The PAS contains three principal amino-acids, Trp279, Tyr70 and Asp72. This was established by site-directed mutagenesis and by binding of inhibitors such as propidium, BW284C51, *d*-tubocurarine and the mamba venom toxin, fasciculin (Radic *et al.*, 1991, 1994; Eichler *et al.*, 1994; Barak *et al.*, 1994), as well as by solution of the 3D structures of complexes with decamethonium (Harel *et al.*, 1993), fasciculin (Bourne *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 1995), BW284C51 (Felder *et al.*, 2002) and, most recently, of complexes of three low-molecular-weight PAS inhibitors with mouse AChE (Bourne *et al.*, 2003). The fact that, at high concentrations, ACh affects the binding of PAS inhibitors suggests that the site at which they bind is equivalent to, or overlaps with, the PAS for ACh (Radic *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1994; Barak *et al.*, 1994; Eastman *et al.*, 1995; Radic *et al.*, 1997; Rosenberry *et al.*, 1999). It has also been proposed that the PAS plays a role in substrate inhibition (Radic *et al.*, 1991; Shafferman *et al.*, 1992a; Eichler *et al.*, 1994; Rosenberry *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003), by a mechanism in which binding of ACh at the PAS hampers choline exit from the active site (Shafferman *et al.*, 1992a; Rosenberry *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Stojan *et al.*, 2004).

It was early suggested that substrate inhibition involves retardation of deacetylation due to binding of ACh to the acetylated enzyme (Krupka and Laidler, 1961). A combination of these models led to the proposal of a more sophisticated mechanism for substrate inhibition, which involves binding of two ACh molecules in the gorge of the acetylated enzyme, thereby obstructing access of water, and thus hindering deacetylation (Stojan *et al.*, 2004). The molecular basis for substrate inhibition of AChE, however, remains controversial.

Despite the extensive kinetic and structural studies outlined above, no direct structural evidence has been presented for the mode of binding of a substrate to AChE. In the following, we describe the crystal structures of four catalytically relevant complexes of *TcAChE*: one with a non-hydrolysable substrate analogue, 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium (OTMA), two with the enzymatic substrate acetylthiocholine (ATCh) soaked into the crystal at two different concentrations, and one with the product thiocholine (TCh), solved at 2.6, 2.3, 2.15 and 1.95 Å resolution, respectively. Our results provide direct structural insight into the *TcAChE* catalytic pathway, through a series of "snapshots" of this enzyme in action. Furthermore, they present a structural view of the mechanism(s) resulting in substrate inhibition.

Materials and methods:

Materials

ATCh was purchased from Sigma (St. Louis, MO), and TCh was obtained by its hydrolysis at pH 12. The non-hydrolysable substrate analogue, 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium iodide (OTMA), was synthesized according to Thanei-Wyss and Waser (1989). The inhibition constants of choline and OTMA for *TcAChE* were determined to be 950 μ M and 68 μ M respectively (data not shown). The pS curves corresponding to *TcAChE* hydrolysis of ATCh in the presence of choline or OTMA were fitted according to the model described by Stojan and collaborators (Stojan *et al.*, 2004); hence, the inhibition constants correspond to the affinity constants for the PAS.

Kinetics of ATCh hydrolysis

Hydrolysis of ATCh iodide was measured spectrophotometrically at 412 nm by the Ellman method (Ellman *et al.*, 1961), at 25°C, in 25 mM phosphate buffer, pH 7. Substrate

concentrations were 4 μ M-200 mM, with a minimum of 10 repetitions per concentration value. Activity was followed for 1 min after addition of the enzyme to the mixture, and spontaneous hydrolysis of substrate was subtracted. The data were analysed by multiple non-linear regressions, using the model and equation of Stojan and colleagues (Stojan *et al.*, 2004), and the program GOSA (www.bio-log.biz).

Crystallization of TcAChE and soaking procedure

TcAChE was purified as described (Sussman *et al.*, 1988, Raves, 1998). Trigonal crystals (space group $P3_121$) of native TcAChE were obtained at 4°C by the hanging-drop vapor diffusion method, employing polyethyleneglycol 200 (PEG200) as precipitant. The mother liquor was 32% PEG200/0.15 M morpholinoethylsulfonic acid (MES), pH 5.8-6.2, and a protein concentration of 11.5 mg/ml was used. TcAChE crystals were soaked at 4°C in mother liquor at pH 6.0, containing either 0.5 mM OTMA (24 h in 5 μ l soaking solution), 20 mM TCh (12 h in 5 μ l soaking solution), 500 mM ATCh (40 min in 1.5 ml soaking solution) or 20 mM ATCh (12 h in 200 μ l soaking solution). When 20 mM ATCh was employed, crystals were transferred every hour into a fresh 20 mM ATCh solution, the last transfer being 10 min prior to flash-cooling of the crystal.

Data collection

Due to the cryoprotective capacity of PEG200, all crystals were directly mounted in a cryo-loop and flash-cooled in a nitrogen stream at 100 K. X-ray diffraction data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) on beamlines BM30A (CRG FIP), ID14-EH2 or ID29. Data sets were indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV (Kabsch, 1993). For details see Table I.

Structure determination and refinement

The native structure of *TcAChE* (PDB entry code 1EA5), without water and sugar molecules, was used as the starting model for rigid body refinement of all four data sets in the resolution range of 20–4 Å. Subsequently, all data sets underwent simulated annealing to 7500 K, with cooling steps of 10 K, followed by 250 steps of conjugate-gradient minimization. Diffraction data from 20 Å to the highest resolution limits were used for refinement, and maps were calculated using all data between 15 Å and the highest resolution limits. Graphic operations, modeling and model building were performed either with TURBO-FRODO (Roussel and Cambillau, 1989) or COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Energy minimization and individual B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinement and map calculation were performed using either CNS version 1.1 (Brünger *et al.*, 1998) or the REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) and FFT modules of the CCP4 suite (CCP4, 1994). In order to compute the F_o - F_c omit maps (Fig. 4, 6, 7), 10 cycles of energy minimization and individual B-factor refinement were performed after omitting the ligands from the model. Structure refinement was evaluated using PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). All structures displayed better values than projected for their resolution limit with respect to all PROCHECK criteria. Fig. 4–8 were produced using PyMOL (DeLano, 2002). Solvent-accessible surfaces in Fig. 5 were calculated using VOIDOO (Kleywegt, 1994). Parameters and topologies of TCh, ATCh, OTMA and PEG200 were generated using the PRODRG server of Dundee University (Schuettelkopf and van Aalten, 2004). Refinement statistics are shown in Table I.

In the OTMA/*TcAChE* complex two OTMA molecules could be fitted to the experimental electron density, as evidenced by peaks above 5σ at both the active site and the PAS in the initial F_o - F_c map. That at the active site had its quaternary group adjacent to Trp84 and its methylcarbonyl moiety positioned near Ser200. An attempt was made to covalently link the

OTMA molecule to the catalytic serine (distance of 1.4 Å), as would be the case if a hemiketal had formed (*i.e.* the tetrahedral intermediate that would form upon binding of OTMA to the catalytic serine) (Harel *et al.*, 1996). Subsequent refinement resulted in appearance of a very small negative density peak in the $F_o - F_c$ map between OTMA and Ser200O γ . If, instead, a non-bonded interaction was modeled in which the carbonyl carbon of OTMA was moved 2.6 Å away from the Ser200O γ , a strong positive peak was observed between the two atoms. Hence, the substrate analogue was modeled as covalently linked to the catalytic serine. Even though a symmetry-related *TcAChE* molecule covers the gorge entrance in the trigonal crystal form, electron density was observed at the PAS, into which another OTMA molecule was modeled. Its quaternary group is adjacent to Trp279, with the 4-oxo-pentyl chain pointing down the gorge.

In order to localize ATCh and TCh in their respective complexes, the level of the initial $F_o - F_c$ map was raised above 5σ to identify and position the strongly diffracting sulphur atom. Only in the case of the TCh molecule in the CAS of the TCh/*TcAChE* complex was the electron density of the TMA moiety at a higher sigma level than that of the sulphur atom. No clear peaks were visible in an anomalous difference map that could have reinforced the identification of the sulphur atoms. To unequivocally assign substrate and/or product molecules in the substrate/enzyme complexes, a TCh molecule was first fitted into the difference density displayed at 3σ , and then added to the model. The TCh molecule was retained if no major residual peaks were detected in the difference map after a round of refinement. In the 500 mM ATCh/*TcAChE* complex, however, the initial $F_o - F_c$ positive density in the active site was not straightforwardly interpretable, given its shape and extent. When a TCh molecule was fitted into the density and included in the model, a very strong positive peak appeared in the subsequent $F_o - F_c$ map, indicating that a molecule larger than TCh is present at that site. When the electron density was displayed at 6σ , only two peaks of

density remained. An ATCh molecule was modeled to span them, with its sulfur atom fitted into the strongest and most elongated peak, just below Phe330, and the tetramethylammonium (TMA) moiety into the other one, near Glu199. Models with two molecules in alternate conformations (either two ATCh or two TCh molecules) did not explain the observed electron density convincingly.

Results

Kinetics of ATCh hydrolysis by TcAChE

The rate of hydrolysis of ATCh by TcAChE was measured as a function of ATCh concentration (Fig. 2). Enzymatic activity follows an apparent Michaelian behaviour up to 0.5 mM ATCh, above which concentration substrate inhibition is observed, and the specific activity gradually decreases to zero. The data were fitted by multiple non-linear regressions using a model that assumes two substrate-inhibition mechanisms (for details see Stojan *et al.*, 2004). The transition between the two mechanisms was calculated to be at 100 mM, where both substrate-inhibited species are populated to a similar extent (see *Supplementary Material* for more details). Substrate concentrations below (20 mM) and above (500 mM) this transition were chosen for the crystal soaks, in order to preferentially accumulate either one or the other of the two substrate-inhibited species.

In order to address the influence of changes in ionic strength, we repeated the activity measurements in the presence of 270 mM and 1 M NaCl (*i.e.* at ionic strengths that exceed the maximum ionic strength in figure 2; data not shown). The activity curves with NaCl are shifted to higher substrate concentrations, yet the shape of the activity curves, with and without NaCl, is virtually identical with a deviation from a single substrate inhibition mechanism being visible in all cases.

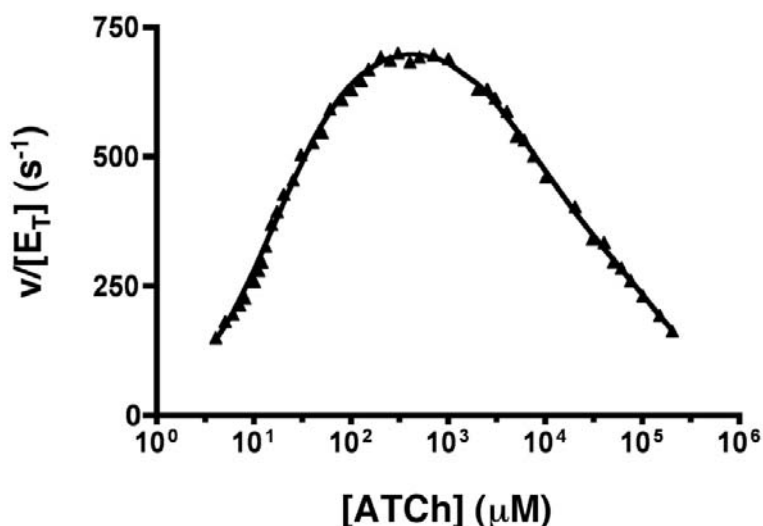


Fig. 2: pS curve for ATCh hydrolysis by *TcAChE*. The rate of hydrolysis (triangles) is shown as a function of ATCh concentration. The data were fitted (plain line; global correlation coefficient of 0.9984) by using an equation based on a model accounting for two different substrate inhibition phenomena (Stojan *et al.*, 2004). The following set of kinetic parameters describes the data: acetylation rate: $k_2=65300\text{ s}^{-1}$; deacetylation rate: $k_3=872\text{ s}^{-1}$; substrate affinity for the PAS: $K_P=136\text{ }\mu\text{M}$; ratio of substrate molecules at the PAS sliding to the CAS of the free enzyme: $1/K_L=0.089$; ratio of substrate molecules at the PAS sliding to the CAS of the acetylenzyme: $1/K_{LL}=0.0016$; coefficient for activation of deacetylation due to the PAS being occupied by a substrate molecule: $a=1$; coefficient for inhibition of choline exit due to the PAS being occupied by a substrate molecule: $b=0.008$. The transition between the two substrate inhibition mechanisms was calculated to occur at around 100 mM (see *Supplementary Material* for details).

Structure of the OTMA/*TcAChE* complex (2.6 Å)

OTMA differs from ACh only in the replacement of the ester oxygen by a carbon (Fig. 3). In the OTMA/*TcAChE* complex, two OTMA molecules are seen, one within the active site and one at the PAS (Fig. 4A). Binding of OTMA in the active site produces minor shifts ($<0.5\text{ Å}$) in Ser200 and His440, hydrogen bonding within the catalytic triad being conserved. OTMA is positioned between Ser200 and Trp84 (Fig. 4A, B). Its quaternary group makes cation- π interactions with Trp84 and Phe330, with distances between the two closest carbon atoms of 3.6 and 5.5 Å, respectively. Further stabilization of the quaternary moiety can be ascribed to electrostatic interaction with the acidic side chain of Glu199 (distance between Glu199O ϵ 2 and the quaternary nitrogen: 4.2 Å). The carbonyl oxygen hydrogen bonds to Gly118N, Gly119N and Ala201N in the oxyanion hole (distances: 2.9, 2.5 and 2.7 Å, respectively). The position of the carbonyl carbon of the substrate analogue relative to Ser200O γ is modeled at a

covalent-bonding distance of 1.4 Å (Fig. 4B). An attempt to model a non-bonded interaction (2.6 Å) produced a strong discrepancy with the experimental electron density (cf. Materials and Methods).

At the PAS, a second OTMA molecule is seen, with its CH₃CO moiety pointing towards the active site (Fig. 4C). Its quaternary group makes cation- π interactions with the aromatic rings of Trp279 and Tyr70 (distances between the closest carbon atoms of 3.1 and 3.4 Å, respectively), and its carbonyl oxygen is weakly H-bonded to Tyr121O ζ (3.3 Å).

The most prominent conformational change observed in the enzyme molecule is a movement of the aromatic rings of Phe330 and Phe331 towards the active site (Fig. 5A). As a consequence, the bottleneck in the gorge becomes even narrower than in the native structure (Fig. 5B), the distance between the van der Waals surfaces of Phe330 and Tyr121 decreasing from ~5 to ~3 Å (Fig. 5). The conformational change results in a cation- π interaction between Phe330 and the TMA group, which enhances stabilization of the OTMA molecule bound at the active site.

Structure of the TCh/TcAChE complex (1.95 Å)

Two TCh molecules are seen in the active-site gorge (Fig. 6). The catalytic serine is not acetylated but displays two alternate conformations. At the CAS, the quaternary moiety of the TCh molecule points towards the entrance of the gorge, making strong cation- π interactions with both Trp84 and Phe330 (distances between the two closest carbon atoms: 3.3 and 3.8 Å, respectively). The same rotation of the Phe330 side chain towards the active site described above for the OTMA/TcAChE complex is observed for the TCh/TcAChE complex, and again results in a strong cation- π interaction with the TMA moiety of the bound ligand. The thiol group is stabilized by a weak hydrogen bond (3.2 Å) with Glu199O ϵ 1.

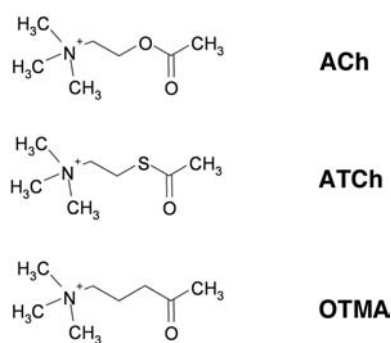


Fig. 3: Structures of acetylcholine (ACh), acetylthiocholine (ATCh) and 4-oxo-N,N,N-trimethylpentanaminium iodide (OTMA).

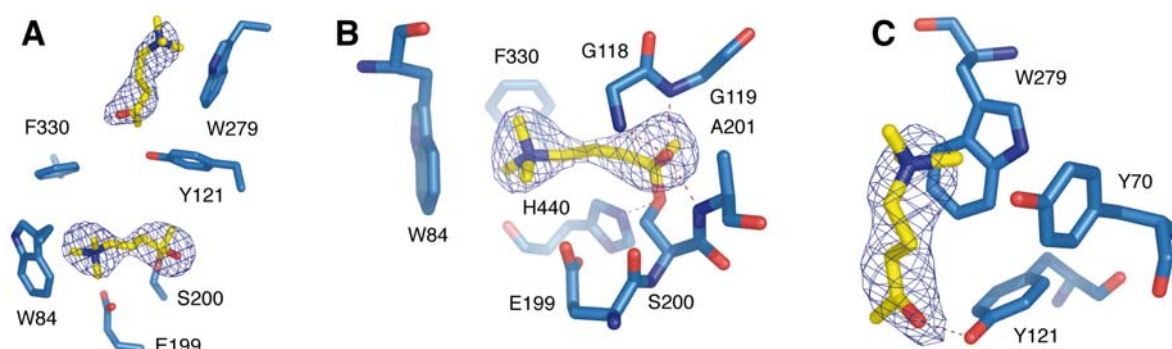


Fig. 4: Binding of substrate analogue molecules in the OTMA/*TcAChE* complex (*A*) Overview of the binding sites; (*B*) Binding of OTMA in the CAS; (*C*) Binding of OTMA at the PAS. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxanion-hole residues (Gly118, Gly119, Ala201) and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440) are shown in (*B*). The PAS residues (Tyr70, Tyr121 and Trp279) are shown in (*C*). The Fo-Fc electron density map (contour level 4 σ), computed without the atomic coordinates of OTMA, is superimposed on the model.

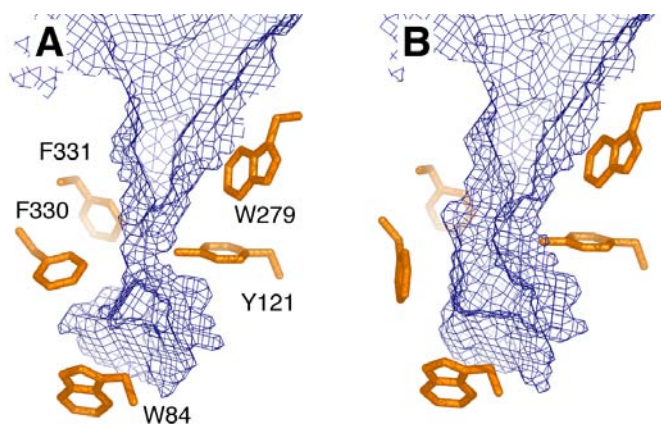


Fig. 5: Rotation of Phe330 and active-site gorge accessibility in (*A*) OTMA/*TcAChE*; (*B*) native *TcAChE*. The water-accessible surfaces were calculated using VOIDOO (Kleywegt, 1994), employing a 1.4 Å probe radius, and taking only protein atoms into account.

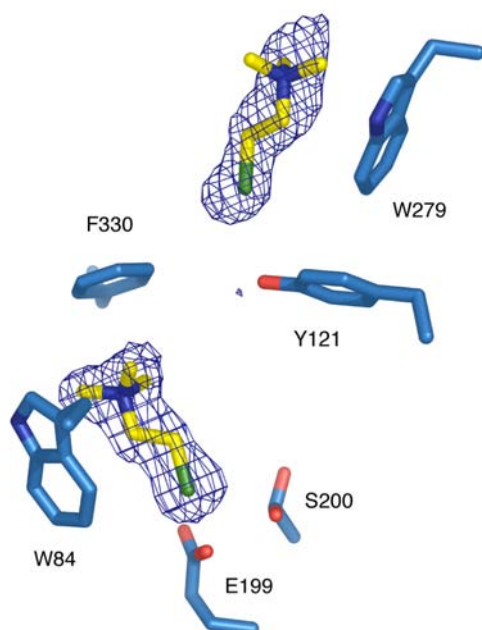


Fig. 6: Binding of TCh molecules in the TCh/*TcAChE* complex. The F_o-F_c electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the TCh molecules, is superimposed on the model. The catalytic serine (Ser200) displays two alternate conformations.

At the PAS, the TCh molecule is stabilized principally by a cation- π interaction between its TMA moiety and Trp279 (distance between the two closest carbon atoms: 3.2 Å). The thiol group points towards the active site, but no clear interaction with any active-site gorge residue is seen. The same structural result, *i.e.* binding of TCh molecules at both the PAS and the CAS, is obtained when crystals are soaked in 2 mM ATCh (data not shown), due to the rapid hydrolysis of ATCh to TCh at this concentration.

Structure of the ATCh/*TcAChE* complex obtained at 20 mM ATCh (2.3 Å)

In this complex, the catalytic serine is acetylated, an ATCh molecule can be assigned at the PAS, and a TCh molecule at the CAS (Fig. 7A). An electron density peak in the initial F_o-F_c map, 1.4 Å from Ser200O γ , is attributed to a covalently bound acetyl group with an occupancy of 0.7 (Fig. 7B). Its carbonyl oxygen points towards the center of the active site, and is hydrogen-bonded to two out of the three constituents of the oxyanion hole (distances of 3.0 and 2.9 Å from Gly118N and Gly119N, respectively). Its methyl group is oriented towards the acyl pocket. Native *TcAChE* crystals obtained from the same enzyme batch did

not display any electron density adjacent to Ser200 (not shown). Consequently, and since enzymatic activity within the crystal has been demonstrated (Nicolas *et al.*, 2001), we conclude that Ser200 had been acetylated by the ATCh in the soaking solution.

The electron density peak within the CAS can be modeled as a TCh molecule (Fig. 7A, B) that binds in the same position and orientation as TCh in the TCh/*TcAChE* complex (Fig. 6). Its TMA group makes a cation- π interaction with the aromatic rings of Trp84 and Phe330 (distances between the two closest carbon atoms of 3.6 and 3.7 Å, respectively). The thiol group is 3.3 Å from Glu199O ϵ 1. The same rotation of the Phe330 side chain described for the OTMA/*TcAChE* and TCh/*TcAChE* complexes is seen, again resulting in a strong cation- π interaction between its phenyl ring and the TMA moiety of the TCh molecule. Thus, in this complex, as in those described above, the gorge is in a closed configuration. At the PAS, the observed electron density is attributed to an ATCh molecule (Fig. 7A) that binds in the same orientation (acetyl group pointing down the gorge towards the active site), and at a similar position, as the substrate analogue in the OTMA/*TcAChE* complex (Fig. 4A, C). Its carbonyl oxygen is hydrogen-bonded to Tyr121O ζ (distance 3.0 Å). The TMA moiety of ATCh makes cation- π interactions with the aromatic rings of Trp279 and Tyr70 (distances between the closest carbon atoms of 3.2 and 3.6 Å, respectively).

Structure of the ATCh/*TcAChE* complex obtained at 500 mM ATCh (2.15 Å)

In this structure, Ser200 is acetylated, and an intact ATCh molecule is assigned at both the active site and the PAS (Fig. 7C). The positive-density peak near Ser200 in the initial Fo-Fc map could not be modeled as a single, covalently linked acetyl group as in the ATCh/*TcAChE* crystal structure obtained at 20 mM ATCh. Instead, two alternate conformations were modeled, one for an acetyl group covalently linked to Ser200, and one for a free acetate group (50% occupancy for each; Fig. 7D). In both conformations, the methyl group points towards

the acyl pocket, and the carbonyl oxygen towards the oxyanion hole (distances: 3.1 and 2.8, 3.1 and 2.5 and 2.8 and 3.2 Å from Gly118N, Gly119N and Ala201N, respectively, for the acetyl and the acetate moieties). The other oxygen of the acetate is hydrogen-bonded to His440Nε2 (distance: 2.8 Å).

The most prominent positive-density peak in the initial Fo-Fc map, at the bottom of the active-site gorge, between Trp84, Glu199 and Phe330, could not be modeled by a TCh molecule as in the ATCh/TcAChE complex obtained at 20 mM ATCh. The density is best modeled by an ATCh molecule (Fig. 7D). Its TMA moiety points toward the bottom of the gorge, electrostatically stabilized by the Glu199 side chain (distance between Glu199Oε1 and the quaternary nitrogen: 3.3 Å), and is in cation-π interaction with Trp84 (distance between the two closest carbon atoms: 3.1 Å). One of the three methyl groups is 2.8 Å from Glu199Oε1. Such a relatively short distance is also sometimes observed in crystals of small organic molecules. Thus a 2.5-2.9 Å distance between a carbonyl oxygen and a methyl group was detected in 82 entries (with an R factor <5%) in the Cambridge Small Molecule Data Base. The CH₃CO group also makes a carbonyl-carbonyl interaction (Allen *et al.*, 1998; Deane *et al.*, 1999) with the main-chain carbonyl of His440. A sulfur-π interaction (Bourne *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 1995) with the Phe330 side chain in one of the two alternate conformations (distance between the two closest non-hydrogen atoms: 3.7 Å) might also contribute to stabilization.

At the PAS, the density can be attributed to an ATCh molecule (Fig. 7C) that binds in the same orientation (CH₃CO group pointing towards the active site), and at a similar position, as the substrate analogue in the OTMA/TcAChE complex (Fig. 4C) and as the ATCh molecule in the ATCh/TcAChE complex obtained at 20 mM ATCh (Fig. 7A).

The side chain of Phe330 appears to adopt two alternate conformations that both result in a closed configuration of the gorge. Each of them is stabilized by a hydrophobic interaction

with the methyl moiety of the CH_3CO group of the ATCh molecule either in the CAS or at the PAS (distances between the two closest non-hydrogen atoms of 3.2 and 2.8 Å, respectively).

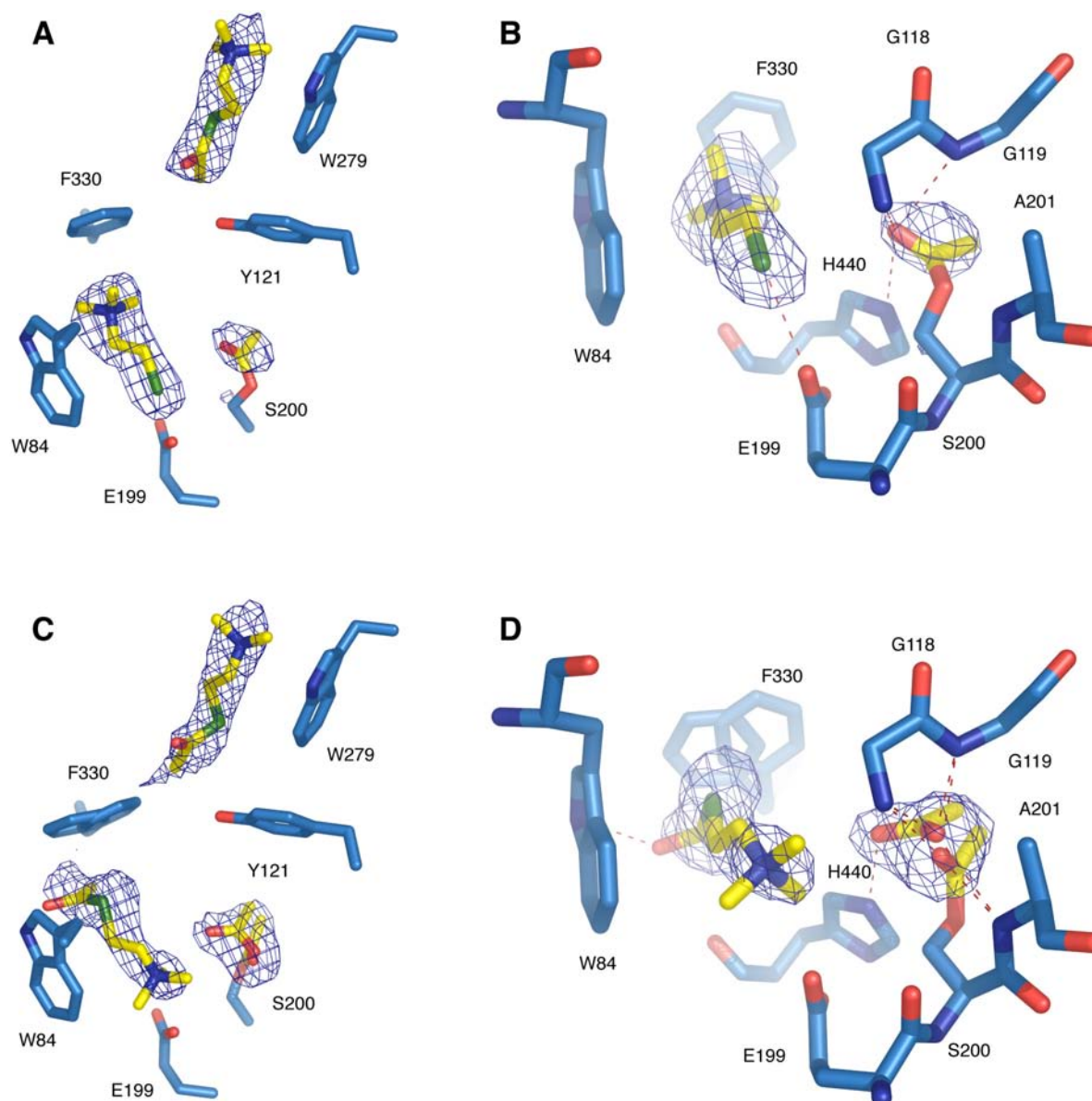


Fig. 7: Substrate and product binding sites in substrate-inhibited *TcAChE* at 20mM ATCh (*A* and *B*) and at 500mM ATCh (*C* and *D*). (*A*) Overview of the binding sites; (*B*) Acetylation of the catalytic serine and binding of TCh in the active site. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxyanion hole residues (Gly118, Gly119 and Ala201), and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440), are shown. The Fo-Fc electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the ATCh and TCh molecules and of the acetyl group linked to Ser200, is superimposed on the model. (*C*) Overview of the binding sites; (*D*) Acetylation of the catalytic serine and binding of ATCh in the active site. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxyanion hole residues (Gly118, Gly119 and Ala201), and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440), are shown. The Fo-Fc electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the ATCh molecules and of the acetyl and acetate groups, is superimposed on the model.

Discussion

The focus of this study was on identification of substrate and product-binding sites in *TcAChE* that may shed light on intramolecular substrate, product and solvent traffic during catalysis. Due to the high turnover number of AChE (Rosenberry, 1975; Quinn, 1987), it has not been possible to obtain a crystal structure for the functional enzyme-substrate complex, *viz.* that which forms at low substrate concentrations. We overcame this problem by adopting two approaches. One was to solve the structure of a complex with *TcAChE* of a non-hydrolysable substrate analogue, OTMA. The other was to solve the structure of ATCh/*TcAChE* complexes for which the substrate had been soaked into the crystal at such high concentrations that the enzyme was inhibited by excess of its own substrate. The latter structures provide a molecular description of substrate inhibition in AChE. The structure of a TCh/*TcAChE* complex revealed binding sites for the enzymatic product, choline. Taken together, these structures permit a detailed structural description of substrate traffic during *TcAChE* catalysis (Fig. 8), which can be correlated with kinetic data for *TcAChE* and for other AChEs.

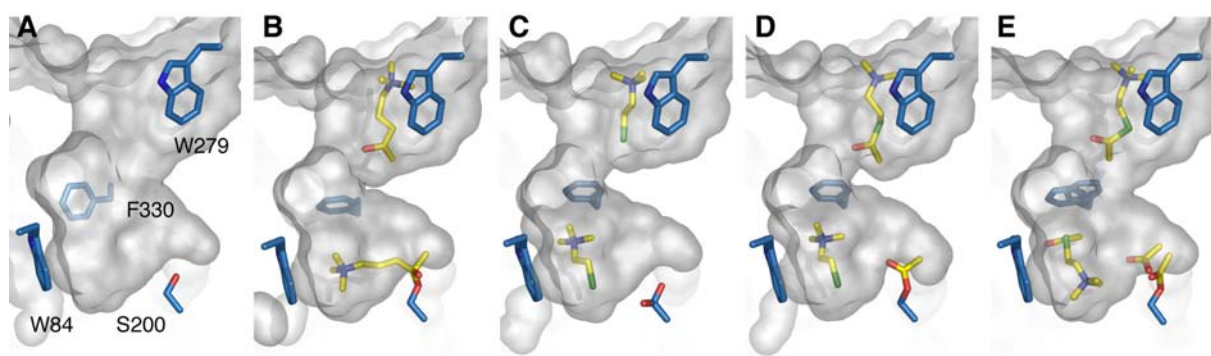


Fig. 8: Molecular surfaces of the active-site gorge in native *TcAChE* (A), and in the OTMA/*TcAChE* (B), 20mM TCh/*TcAChE* (C), 20mM ATCh/*TcAChE* (D) and 500mM ATCh/*TcAChE* (E) complexes. OTMA, ATCh and TCh are shown as yellow sticks, as is the acetyl group on Ser200 in (D,E).

Non-hydrolysable substrate-analogue binding and structural changes

The substrate analogue OTMA (Thanei-Wyss and Waser, 1989) mimics the natural substrate, ACh, except that the ester oxygen is replaced by a carbon (Fig. 3). Consequently, OTMA cannot be hydrolysed by AChE, and acts as a competitive inhibitor with a similar affinity as the substrate (Stojan *et al.*, 2004). The structure of the OTMA/*Tc*AChE complex reveals two binding sites, at the active site and at the PAS (Fig. 8B). The position of OTMA in the active site is very similar to that suggested for ACh by molecular modeling (Sussman *et al.*, 1991), and from inspection of the structure of a complex of *Tc*AChE with the potent transition-state analogue, *m*-(*N,N,N*-trimethylammonio)-2,2,2-trifluoroacetophenone (TMTFA, Harel *et al.*, 1996). The quaternary nitrogen atom of OTMA makes a cation- π interaction with Trp84, and the CH₃CO moiety is covalently linked to Ser200O γ . Thus, the OTMA molecule binds in the active site just as a substrate molecule would be expected to bind prior to catalysis. This structure represents the hemiketal equivalent of the tetrahedral intermediate that forms subsequent to productive substrate binding (Michaelis-Menten complex).

At the PAS, an OTMA molecule is seen, with its CH₃CO moiety oriented towards the active site, and its quaternary nitrogen in cation- π interaction with Trp279. Its detection is in agreement with the predictions of kinetic and structural studies suggesting that the peripheral site serves as a functional substrate-binding site (Radic *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1994; Barak *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 1995; Bourne *et al.*, 2003).

In the OTMA/*Tc*AChE complex, the side chain of Phe330 rotates towards the active site. Consequently, the OTMA molecule in the CAS is further stabilized by cation- π interaction with the phenyl ring of Phe330. This residue, together with Tyr121, forms a bottleneck in the gorge of native *Tc*AChE, restricting substrate access to the active site. The observed rotation further decreases access to the active site, and obviously reduces the catalytic volume (Fig. 5 and 8B). The increased confinement may contribute to the high catalytic efficiency for two

reasons. First, the probability of substrate hydrolysis is increased with reduction of the reaction volume; secondly, the activation barrier for the formation and decay of the tetrahedral intermediate may be decreased due to substrate desolvation (Bohme & Mackay, 1981; Madura & Jorgensen, 1986; Harel *et al.*, 1996). The TCh/*TcAChE* structure (Fig. 8C), together with the 20 mM ATCh/*TcAChE* structure (Fig. 8D), demonstrate that the closing of the gorge, mediated by Phe330 side chain rotation towards the active site, is related to the binding of a TMA moiety in the CAS, rather than to the binding of a substrate molecule at the PAS. Indeed, whatever moiety is present at the PAS, a closed conformation of the gorge is always observed when an ATCh or a TCh molecule is present at the active site. An identical rotation of Phe330 is observed in the complex structure of *TcAChE* with TMTFA (Harel *et al.*, 1996). If expulsion of the choline product by the enzyme occurs along the gorge axis, it will require expenditure of energy, since Phe330 will have to rotate back to its original position for the gorge to assume its open state.

Substrate inhibition in acetylcholinesterase

TcAChE, like other AChEs, is inhibited by high concentrations both of its natural substrate, ACh, and of its close analogue, ATCh (Ellman *et al.*, 1961). It was, therefore, anticipated that soaking the substrate into *TcAChE* crystals at a high concentration might both yield the structure of the substrate-inhibited enzyme, and allow identification of binding sites relevant to substrate traffic and inhibition. ATCh was preferred over ACh, because the higher scattering power of its sulphur atom, compared to the corresponding oxygen in ACh, facilitated identification of substrate molecules and assignment of their orientations. Moreover, this substrate displays kinetic properties virtually identical to those of ACh, and is employed in nearly all kinetic studies on AChE.

The substrate-inhibited structures obtained at the high and moderate substrate concentrations differed significantly. In the complex obtained at 20 mM ATCh, the catalytic serine (Ser200) is acetylated, a TCh molecule is seen at the CAS, and an ATCh molecule at the PAS (Fig. 8D). At 500 mM, Ser200 is acetylated with partial occupancy (~50%), a free acetate group (~50% occupancy) is found nearby, and two ATCh molecules are seen, one at the active site, and the other at the PAS (Fig. 8E).

In order to facilitate correlation of the observed species with the kinetic data, it is useful to summarize the possible steps involved in substrate catalysis in the absence of inhibition:

- 1) The substrate enters the active site and binds to form a covalent complex with Ser200 (tetrahedral intermediate).
- 2) Collapse of tetrahedral intermediate, with choline as the leaving group. Ser200 is now acetylated and choline is still bound to the CAS.
- 3) Choline leaves the active site, and exits the enzyme *via* the gorge.
- 4) A water molecule attacks the carbon atom of the acyl group, and a new tetrahedral intermediate is formed.
- 5) The tetrahedral intermediate collapses, with Ser200 as the leaving group; acetate remains bound in the active site.
- 6) Acetate leaves the active site and exits the enzyme *via* the gorge.

The different structures seen at 20 mM and 500 mM ATCh are consistent with kinetic data that propose two concentration-dependent modes of substrate inhibition (Stojan *et al.*, 2004). At moderate degrees of substrate inhibition, as steps 1 and 2 above are ongoing, a substrate molecule can bind at the PAS at the top of the gorge. This prevents step 3, choline exit, from proceeding rapidly, and causes a buildup of the species seen in the crystal structure (Fig. 8D): Ser200 is acetylated, TCh is bound at the CAS, and a substrate molecule occupies the PAS.

Since binding of substrate at the PAS is reversible, windows of opportunity exist for TCh to escape from the gorge. Once TCh has left the CAS, water can attack the acetylated enzyme, and acetate can escape before a new substrate molecule enters the gorge. This model allows both for slow turnover and for increased occupancy of the CAS by TCh, as predicted by several kinetic models (Shafferman *et al.*, 1992a; Szegletes *et al.*, 1998; Rosenberry *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Stojan *et al.*, 2004). Inhibition in this case is caused by retardation of TCh clearance from both the active site and the gorge.

At high substrate concentration, TCh can still escape in the now rare eventuality that the PAS is free, and water can gain access to Ser200. In this case, however, the gorge is rapidly saturated by substrate molecules before acetate can even leave the acyl-binding pocket. Although a substrate molecule can bind at the CAS, its CH₃CO group cannot enter the acyl-binding pocket because the acetate has never cleared the active site. Instead, the CH₃CO group is forced to bind in a groove close to Phe330 and His440, which explains the different orientations of ATCh and TCh in the active site. The acetyl group at Ser200 remains in equilibrium between the acyl form and the free acetate molecule (see Wilson, 1951), as observed in the crystal structure (Fig. 8E). Inhibition, in this case, is caused by prevention of acetate escape from the active site as a result of binding of two substrate molecules (Krupka & Laidler, 1961; Stojan *et al.*, 2004).

The interaction with Glu199 of ATCh at 500 mM (electrostatic interaction with the TMA group; Fig. 7D) provides an explanation for abolition of substrate inhibition in the *TcAChE* Glu199Asp (Gibney *et al.*, 1990; Radic *et al.*, 1992) and the corresponding HuAChE Glu202Asp mutants (Shafferman *et al.*, 1992a). Indeed, the substrate may be drawn deeper into the mutant active site, thus permitting deacetylation of Ser200 and acetate clearance to occur despite the presence of a substrate molecule. Likewise, the interactions with Phe330 of the TCh molecule in the active site at 20 mM (a cation- π interaction involving the TMA

group) and of the ATCh in the active site at 500 mM (a sulphur- π interaction) rationalize the displacement of the substrate inhibition curve reported when this residue is replaced by a non-aromatic one (Shafferman *et al.*, 1992a; Barak *et al.*, 1994; Stojan *et al.*, 2004).

It may be asked if the substrate concentrations used in this study are close to physiologically-relevant values at the synapse. A recent study estimates the ACh content of the synaptic vesicle to be ~ 500 mM (Van der Kloot *et al.*, 2002). It is thus plausible that passive diffusion, coupled with rapid pore opening (Stiles *et al.*, 1996) would result in local ACh concentrations in the cleft far in excess of the concentration of ~ 10 mM at which significant substrate inhibition is observed (Fig. 2). A delicate balance between substrate inhibition and the high catalytic efficiency of AChE might be crucial to ensuring, *in situ*, that a sufficient amount of ACh reaches the post-synaptic membrane before being hydrolysed.

Structural comparison and relevance for traffic of substrates and products

All but one of the ATCh and OTMA molecules identified in this study have a common orientation; their CH_3CO group points towards the active site (Fig. 8). This is surprising in view of the strong electrostatic field that is aligned with the gorge axis (Ripoll *et al.*, 1993; Felder *et al.*, 1997), the orientation of which should favor the quaternary group of the choline moiety entering first. However, the energy gained by formation of the H-bond between Tyr121 and the CH_3CO group, as well as by the hydrophobic stabilization of the aliphatic part of the substrate within the aromatic gorge, may compensate for the unfavorable orientation with respect to the electrostatic field. In any case, since the CH_3CO group needs to approach the catalytic serine, the observed orientation allows the substrate to slide straight through the gorge without the necessity of reorienting before productive interaction at the active site. The strong electrostatic field may attract an ACh molecule towards the enzyme surface, while

binding at the PAS may serve as a filter that orients the ACh molecule with its CH₃CO group towards the active site.

The only ligand in this study not oriented with its CH₃CO group pointing towards the active site is the ATCh molecule in the CAS at 500 mM substrate concentration (Figs. 7C/D and 8E). It is of interest that this orientation is very similar to the one observed in the 3D structure of the complex of butyrylthiocholine with the ‘aged’ soman conjugate of HuBChE (PDB accession code 1P0P, Nicolet *et al.*, 2003). Phosphorylation of the catalytic serine in HuBChE and its acetylation in TcAChE both prevent productive substrate binding. Concerning the product, TCh, the same binding mode in the active site of TcAChE is observed whether it is generated enzymatically, *in situ* (Figs. 7A/B and 8D), or soaked into the crystal (Figs. 6 and 8C). In the case of HuBChE, a choline molecule binds in the active site (PDB accession code 1P0I, Nicolet *et al.*, 2003) in the same position as TCh in TcAChE, yet rotated by 180 degrees, *i.e.* with its OH group pointing towards the gorge entrance. This is most probably due to the absence of an aromatic residue at position 330. Indeed Phe330 orients TCh in the active site of TcAChE by cation – π interaction with the quaternary nitrogen group. It should also be noted that substrate and product bind at the peripheral site in TcAChE, while no such binding is observed in HuBChE, probably due to the absence of an aromatic residue at position 279.

The synergy of the structures presented provides a series of snapshots of substrate entry into and product exit from the active site in TcAChE (Fig. 8). The substrate enters the gorge with its CH₃CO group pointing inwards, and binds at the PAS, being stabilized mainly by cation- π interactions with Trp279 and Tyr70, and by a hydrogen bond with Tyr121 (Fig. 4C, 8B). Subsequently, it passes the Tyr121/Phe330 bottleneck. If Ser200 is free (*i.e.* not acetylated), the substrate can form first a Michaelis-Menten complex, and then the tetrahedral intermediate. The latter is seen in the OTMA/TcAChE complex (Fig. 4B and 8B). The

substrate probably maintains a cation- π interaction with Phe330 throughout its approach to Ser200, which may be responsible for the conformational change in Phe330 (Fig. 5) that results in the increased confinement of the active site during the hydrolytic step of catalysis, as discussed above. After hydrolysis, the choline product is expelled, with Ser200 remaining acetylated. We have identified two TCh binding sites within the gorge that may be on its exit trajectory, one at the CAS, and the other at the PAS (Fig. 6, 8C).

This study provides, for the first time, insight into substrate and product binding sites in an AChE molecule. Extensive structural data on AChEs from various species, including, in addition to *Torpedo* electric organ, mammalian (Kryger *et al.*, 2000; Bourne *et al.*, 2003) and invertebrate (Harel *et al.*, 2000) sources, have shown that their overall fold and active site architecture are highly conserved. Furthermore, all AChEs examined have been shown to display substrate-inhibition (Alles and Hawes, 1940; Rosenberry, 1975; Radic *et al.*, 1991; Shafferman *et al.*, 1992a; Eichler *et al.*, 1994; Marcel *et al.*, 1998; Szegletes *et al.*, 1998; Rosenberry *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Stojan *et al.*, 2004). For these reasons, it is reasonable to suggest that the insight into substrate and product traffic presented here can be generalized to AChEs from other species.

Table I : Data collection and refinement statistics:

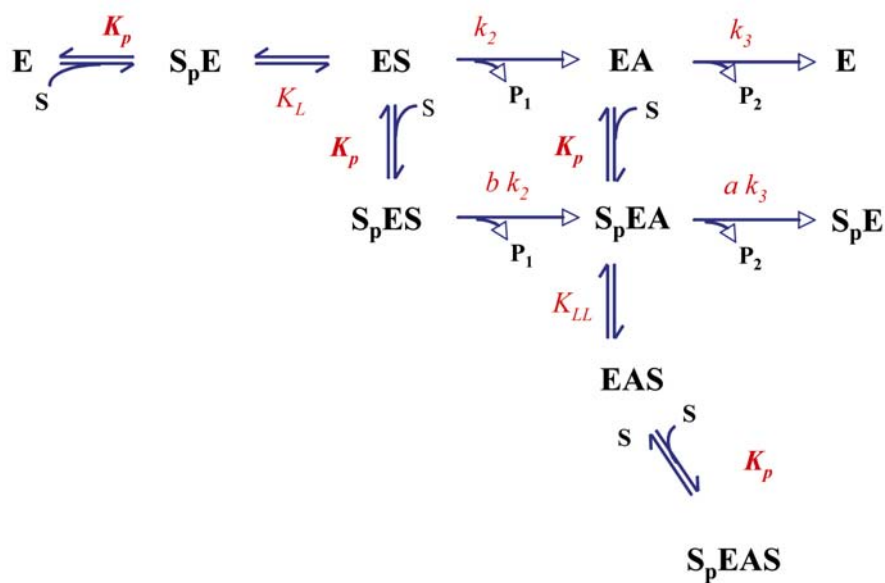
	<i>TcAChE</i> in complex with OMTA	<i>TcAChE</i> in complex with TCh	<i>TcAChE</i> in complex with ATCh at 20 mM	<i>TcAChE</i> in complex with ATCh at 500 mM
PDB accession code	2C5F	2C5G	2C58	2C4H
ESRF Beamline	BM30A	ID14-EH2	ID14-EH2	ID29
Temperature (K)	100	100	100	100
Oscillation Step (°)	1	1	1	1
Number of frames	120	120	120	120
Exposure time (sec/frame)	30 unatt. beam	2 unatt. beam	3 unatt. beam	2 20x att. beam
Wavelength (Å)	0.980	0.933	0.933	0.976
Unit cell parameters (Å)				
a=b	112.26	112.52	113.35	111.99
c	137.00	137.37	138.03	137.12
Resolution range (Å)	20.00 - 2.60 (2.70 - 2.60) ^(*)	20.00 - 1.95 (2.00 - 1.95)	20.00 - 2.30 (2.35 - 2.30)	20.00 - 2.15 (2.20 - 2.15)
Completeness (%)	97.8 (97.0)	99.0 (95.6)	100.0 (99.7)	99.6 (98.9)
R _{merge} (%) ^(#)	8.1 (29.4)	6.4 (49.2)	5.3 (46.9)	5.8 (43.9)
I/σI	16.12 (5.92)	19.74 (5.30)	22.63 (4.43)	22.14 (4.24)
Unique Reflections	30545	72944	45972	54312
Redundancy	5.99	7.39	7.14	7.34
Observations/parameters ratio	1.45	3.14	2.15	2.45
R _{cryst.} (%)	16.26	16.03	17.14	16.70
R _{free} (%)	21.95	18.60	21.01	20.90
r.m.s.d. bond length (Å)	0.007	0.006	0.006	0.006
r.m.s.d. bond angles (°)	1.335	1.395	1.335	1.344
r.m.s.d with respect to native structure (Å) (PDB accession code 1EA5)	0.1840	0.1339	0.2123	0.2388
Number of atoms	5249	6003	5341	5543
Protein	4342	4526	4424	4501
Carbohydrate	28	28	28	28
Water	829	1408	822	949
Ligands & ions	50	41	67	65
Wilson B factor (Å ²)	42.6	20.7	38.2	27.9
Average B factor (Å ²)	49.3	38.5	53.0	41.2
Protein	46.1	28.5	48.9	36.3
Carbohydrate	77.0	52.5	74.5	64.0
Water	63.5	61.1	72.0	62.4
Ligands & ions	78.3	64.7	82.8	62.4

$$^{(*)} R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$$

^(*) Values in brackets are for the highest resolution shells

Supplementary Materials :*Kinetics of ATCh hydrolysis and choice of crystals soaking concentrations*

The rate of hydrolysis of ATCh by *TcAChE* as a function of ATCh concentration (Figure 6) was analyzed by multiple non-linear regressions, using the model (Scheme SM1) and equation of Stojan and colleagues (Stojan *et al.*, 2004) and the program GOSA (www.bio-log.biz). This model is the one that best describes the experimental data. The values obtained from the fit for the different kinetic parameters are shown in Table SM1. These parameters were used to estimate the relative proportions of the first and the second substrate-inhibited species as a function of ATCh concentration (Fig. SM2). The first substrate-inhibited species (S_pES) accumulates due to the hampering of choline exit by a substrate molecule at the peripheral anionic site. The second species (S_pEAS) results from the binding of two substrate molecules in the active-site gorge of the acetylated enzyme. The first substrate-inhibition phenomenon has its maximum at ~30 mM ATCh. At 100 mM ATCh, both substrate-inhibited species are populated equally. Substrate concentrations below (20 mM) and above (500 mM) 100 mM were chosen for the crystal soaks, in order to preferentially accumulate either the first or the second substrate-inhibited species.



Scheme SM1 : Kinetic model for ATCh hydrolysis and inhibition in AChE (reproduced from Stojan *et al.*, 2004).

Kinetic parameter	Value	Uncertainty (σ^2)
k_2	65300 sec. ⁻¹	± 48700
k_3	872 sec. ⁻¹	± 49
K_p	136 μ M	± 32
K_L	11.2	± 2.5
K_{LL}	644	144
a	1	0.08
b	0.008	0.002

Table SM1 : Kinetic parameters obtained from fitting the experimental pS curve of TcAChE by use of the model and equation described by Stojan and colleagues (Stojan *et al.*, 2004).

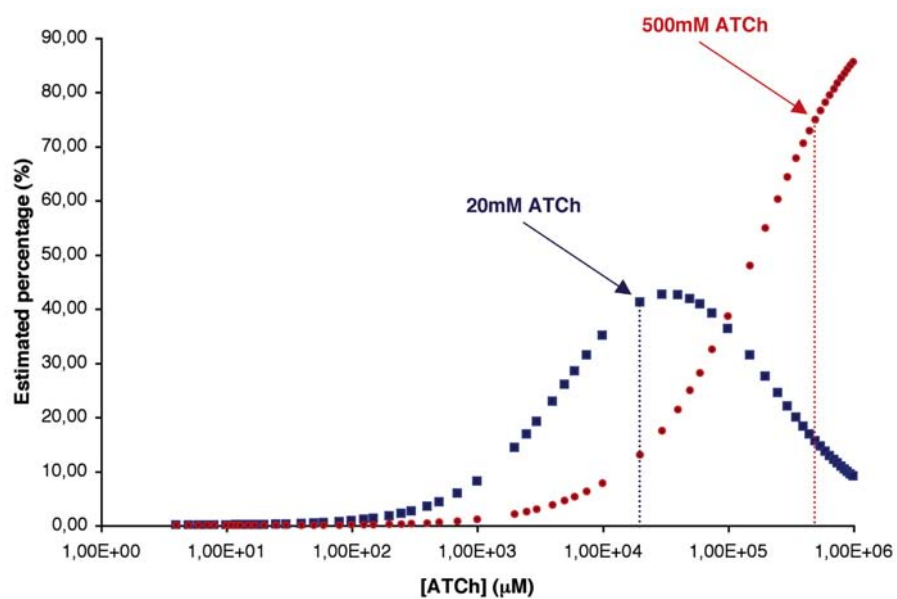


Figure SM2 : Calculated proportions of the two substrate-inhibited species of *TcAChE* as a function of ATCh concentration (blue squares: S_{pES} , red circles: S_{pEAS}).

Acknowledgements

We thank Patricia Amara, Yacov Ashani, Dominique Bourgeois, Otto Dideberg, Adriana Irimia and Antoine Royant for extensive and productive discussions. We are grateful to Joanne McCarthy, Xavier Vernède, and the staff at the ESRF and the French CRG beam-line FIP for help related to data collection. We thank Fred Vellieux for valuable discussions and critical reading of the manuscript. We are grateful to Lilly Toker for purification of *TcAChE*, to Maurice Goeldner and Alexandre Specht for a long-term collaboration and to Juan Fontecilla-Camps for regular access to the X-ray source in his laboratory. MW thanks the MINERVA foundation for a short-term research grant. JPC is supported by a CEA PhD grant. This study benefited from the U.S. Army Medical and Material Command under Contract No. DAMD17-97-2-7022, the EC Vth Framework Contracts QLK3-2000-00650 and QLG2-CT-2002-00988 (SPINE), the Kimmelman Center for Biomolecular Structure and Assembly (Rehovot, Israel), the Benozio Center for Neurosciences, and the Kalman and Ida Wolens Foundation. J.L.S. is the Pickman Professor of Structural Biology.

Kinetic crystallography on acetylcholinesterase

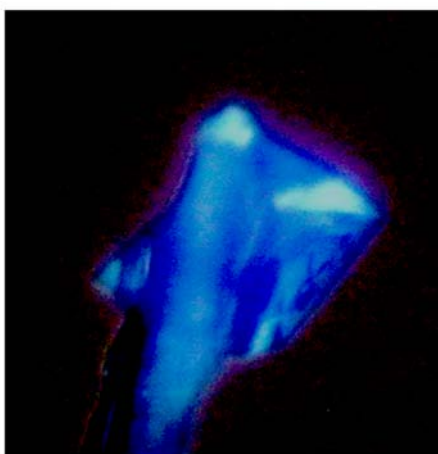
Jacques-Philippe Colletier¹, Antoine Royant², Benoît Sanson¹, Alexandre Specht³, Florian Nachon⁴, Patrick Masson⁴, Giuseppe Zaccai¹, Joel L. Sussman⁵, Maurice Goeldner³, Israel Silman⁶, Dominique Bourgeois² and Martin Weik¹

¹Laboratoire de Biophysique Moléculaire and ²Laboratoire de Cristallogénèse et de Cristallographie des Protéines, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS/UJF) Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS/UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

³ Université Louis Pasteur, 64000 Strasbourg, France

⁴ Unité d'enzymologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France

Departments of Structural Biology⁵ and of Neurobiology⁶, Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel



Colletier *et al.*, (2006c), *to be submitted*.

Abstract

AChE is a very efficient enzyme, essential in the process of nerve impulse transmission at cholinergic synapses. The apparent paradox between its high turnover number and the buried nature of the active site raised cogent questions as to how traffic of substrates and products, to and from the active site, could occur so rapidly in such a confined environment. Here, we present a kinetic crystallography strategy aimed at structurally addressing the issue of substrate and product traffic in acetylcholinesterase, in which UV-laser induced cleavage of a photolabile precursor of the enzymatic product choline (*caged choline*) is combined with temperature-controlled X-ray crystallography. Caged choline was shown to bind in the active and at the peripheral sites of acetylcholinesterase. UV irradiation of acetylcholinesterase in complex with caged choline, during a brief temperature-excursion from 100 K to room temperature, resulted in a 50% reduction of the occupancy of the caged compound. Microspectrophotometric experiments showed that the caged compound indeed had been photocleaved. We conclude that half of all choline molecules present in the crystal have been expelled from both the active and the peripheral sites. A relative movement of the two domains in acetylcholinesterase was triggered by choline release, resulting in an increase of the active-site gorge volume by 25% in one of the two monomers of the asymmetric unit. No localized major conformational changes of amino acids or secondary structure elements were observed that could have hinted at the existence of exit pathways alternative to the gorge. Our results suggest that choline exit from the enzyme after catalysis occurs mainly *via* the gorge, assisted by molecular breathing motions that involve the entire enzyme.

Introduction

X-ray crystallography is a powerful tool, providing static structures of biological macromolecules that are time and space-averaged over a large number of copies ($\sim 10^{15}$) in the crystal. Minor protein conformations in the complex energy landscape of a protein (Frauenfelder *et al.*, 1991) are usually not accessible to conventional X-ray crystallography. Yet, they, and transitions among them, are crucial for biological function to emerge from the synergy of structural and dynamical characteristics of a biological macromolecule. Indeed, excited states involved in catalysis, for example, are populated by only a few percent of the molecules in an ensemble of enzymes (Mulder *et al.*, 2001).

Kinetic crystallography aims at describing structural changes of proteins ‘in action’ (reviewed by Bourgeois & Royant, 2005). It is important to note that most proteins are biologically active in the crystalline state (reviewed by Mozzarelli & Rossi, 1996) and that their conformational diversity is similar in solution and in the crystalline state (Nienhaus *et al.*, 1998). Several different approaches in kinetic crystallography exist. Briefly, either the sequence of conformational changes is monitored in real time in a pump-and-probe experiment (Laue crystallography), or an intermediate state is built up, maintained in a steady-state manner and characterized. Those two strategies involve experiments conducted at close to room temperature (RT). In a third type of approach, intermediate states are either generated at RT and then trapped by flash-cooling the crystal (approach ‘trigger-freeze’) or they accumulate after flash-cooling followed by a transient temperature raise (approach ‘freeze-trigger’) (Ursby *et al.*, 2002). Common to all strategies is the requirement of reaction initiation in the crystal, either by temperature or pH jump, substrate delivery or, in the case of photosensitive samples, by light irradiation. The latter contain mostly proteins with an endogenous photosensitivity that allows the initiation of biological activity. Myo- and hemoglobin, bacteriorhodopsin, photoactive yellow protein and protochlorophyllide

oxidoreductase belong to this group of proteins. Proteins that are not natively photosensitive can, in favorable cases, be rendered photosensitive by employing so-called ‘caged-compounds’, *i.e.* photosensitive precursors of e.g. enzymatic substrates or products (reviewed by Bourgeois & Weik, 2005). Here, we report kinetic-crystallography experiments of the type ‘freeze-trigger-freeze’ on acetylcholinesterase (AChE), one of Nature’s fastest enzymes, making use of a photosensitive precursor of the enzymatic product choline.

The most important function of AChE is the termination of nerve impulse transmission at cholinergic synapses by hydrolysing the neurotransmitter acetylcholine (ACh) into choline and acetic acid (Rosenberry, 1975). AChE catalyses the ACh hydrolysis in a two-step reaction: i/ first, the enzyme is acetylated and the choline product expelled; ii/ secondly, a water molecule regenerates the free enzyme with concomitant release of acetic acid. In accordance with its crucial role, AChE is among the most efficient enzymes, with a turnover number ranging between 10^3 and 10^4 sec^{-1} (reviewed by Quinn, 1987; Silman and Sussman, 2005), depending on the species considered. AChE is the target of a wide spectrum of active molecules, ranging from organophosphorous compounds (insecticides and chemical warfare agents - Smissaert, 1964; Millard *et al.*, 1999) to various natural toxics (*d*-tubocurarine, from the Amazonian poison curare (Golicnik *et al.*, 2001), fasciculin, a peptide from the mamba-snake venom (Marchot *et al.*, 1993)). Furthermore, AChE is the target of the first generation of anti-Alzheimer’s disease (AD) drugs (reviewed by Greenblatt *et al.*, 2003). Therefore, understanding the functioning of AChE, from the molecular level up to the most integrated systems, goes beyond academic interest.

The first structure of an AChE, that of the ray *Torpedo californica* (TcAChE, Sussman *et al.*, 1991), revealed the surprising feature of a deeply buried active site, at the bottom of a narrow gorge. The gorge contains two substrate binding sites: the active site at its bottom, and the peripheral site at its entrance (Figure 1). In the active site, the choline moiety of ACh is

principally stabilized by a cation- π interaction with the indol ring of Trp84, but also interacts with Glu199 and Phe330. The carbonyl moiety also contributes to the stabilisation at this locus, binding its carbonyl oxygen and methyl, in the “oxyanion hole” (Gly117, Gly118 and Asn201) and the “acyl-pocket” (Trp233, Phe288, Phe290 and Phe331), respectively (Harel *et al.*, 1996; Colletier *et al.*, 2006b). The catalytic machinery is that of a typical serine-hydrolase, and is composed of Ser200, His440 and Glu327. The peripheral site is composed of Trp279, Tyr70, Tyr121 and Asp72. Site-directed mutagenesis, kinetics in the presence of inhibitors such as propidium, BW284C51, *d*-tubocurarine and the mamba venom toxin, fasciculin (Radic *et al.*, 1991, 1994, 1995; Eichler *et al.*, 1994; Barak *et al.*, 1994; Golicnik *et al.*, 2001), and solution of the 3D structures of complexes with decamethonium (Harel *et al.*, 1993), fasciculin (Bourne *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 1995) and BW284C51 (Felder *et al.*, 2002) have drawn a clear mapping of AChE peripheral site. Recently, X-ray crystallography revealed the structural details of substrate and product binding at the active and the peripheral sites (Colletier *et al.*, 2006b).

The buried nature of its active site raised cogent questions as to how AChE could attain such a high substrate turnover. The narrowness of the gorge (only 5 Å wide at a bottleneck formed by the van der Waals surfaces of Phe330 and Tyr121) led to the proposition that AChE must undergo significant molecular breathing motions for traffic of substrates and products to occur (Shen *et al.*, 2002). In this context, an alternative ‘backdoor’ exit for the product choline was proposed based on molecular dynamics simulations (Gilson *et al.*, 1994; see also Axelsen *et al.*, 1994). This putative backdoor, unidentified in the static X-ray structure, would open adjacent to the choline binding locus of the active site, *viz.* Trp84. Likewise, an exit trajectory for the second product, acetate, was proposed just behind the “acyl-pocket” (Kovach *et al.*, 1994), involving the 279-290 loop which is disordered in the structure of *TcAChE* complexed with a galanthamine derivative (Greenblatt *et al.*, 2004). Further experimental evidence for

the existence of alternative access and exit routes to and from the active site comes from the absence of a bulky leaving group in a crystallographic study of *TcAChE* conjugated with a gorge-filling inhibitor covalently linked to Ser200 (Bartolucci *et al.*, 1999), and from the residual catalytic activity observed for a complex of AChE with the gorge-capping mamba-venom toxin, fasciculin (Marchot *et al.*, 1993; Eastman *et al.*, 1995; Radic *et al.*, 1994, 1995). Subsequent molecular dynamics studies have provided further evidence for a repertoire of ‘back’ and ‘side’ doors (see e.g. Enyedy *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 2001; Bui *et al.*, 2004). Mutagenesis studies, however, have not, so far, provided any supporting evidence for a functional backdoor (Kronman *et al.*, 1994; Velan *et al.*, 1996; Faerman *et al.*, 1996); thus its existence remains controversial.

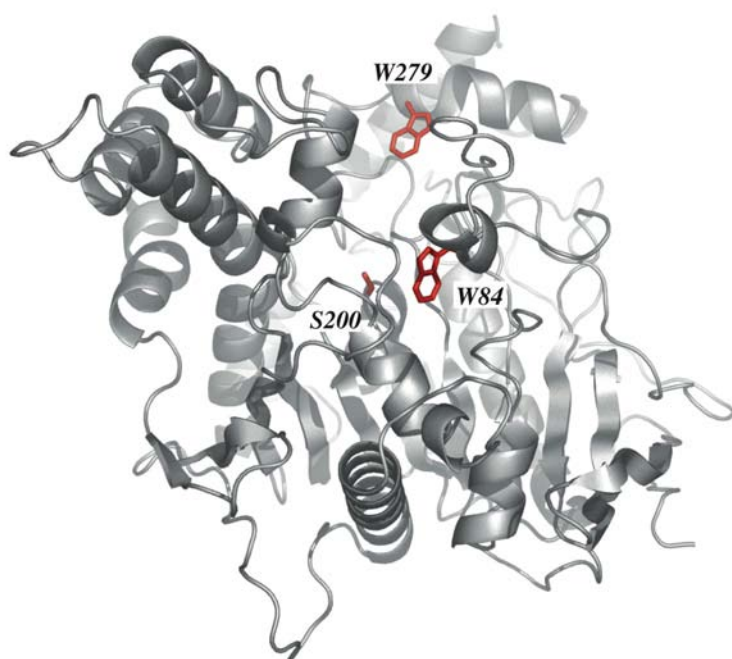


Figure 1: Three-dimensional structure of *TcAChE* highlighting the catalytic serine (Ser200), the main contributor to the stabilisation of ACh in the active site (Trp84), at the bottom of the gorge, and the principal constituent of the peripheral site (Trp279), at the mouth of the gorge.

Studying the traffic of substrates and products within AChE is a challenging enterprise owing to its catalytic rapidity. So far, steady-state kinetic crystallography provided snapshots of substrates and products within the gorge, *en route* to and from the active site (Colletier *et al.*, 2006b). Yet, structural evidence for the existence of alternative entrance or exit pathways, to

and from the active site, has not been obtained. Temperature-controlled protein crystallography, in combination with the cryo-photolysis of caged choline (Specht *et al.*, 2001), is a technique that might provide structural insight into choline clearance from the active site after catalysis (Ursby *et al.*, 2002). In this ‘freeze-trigger-freeze’ approach, caged choline (Peng & Goeldner, 1998) is anticipated to bind in the active site of crystalline AChE at RT prior to flash-cooling. Cryo-photolysis of the caged choline is then achieved by means of laser irradiation during a brief temperature excursion from 100 K to room temperature. The transient temperature raise to room temperature is supposed to free functionally-relevant motions that allow choline clearance to proceed. An intermediate state may then be trapped by virtue of a subsequent re-flash-cooling. In this context, the existence of so-called dynamical transitions is exploited. They mark the onset of anharmonic motions in proteins (Parak *et al.*, 1982 ; Doster *et al.*, 1989), most probably crucial for their biological activity (Rasmussen *et al.*, 1992 ; Lichtenegger *et al.*, 1999 ; Ostermann *et al.*, 2000), that can depend on dynamic changes in the hydration layer surrounding a protein (Fenimore *et al.*, 2004). Dynamical transitions in cholinesterases have been studied by neutron scattering (Gabel *et al.*, 2004; 2005), temperature-controlled X-ray crystallography (Weik *et al.*, 2001a; 2001b) and temperature-derivative microspectrophotometry (Weik *et al.*, 2004). They form the basis for kinetic-crystallography experiments described in the following.

Materials and Methods

Caged compound

Nitro-phenyl-(trifluoro)ethyl-caged arsono-choline (CC : Caged arsonoCholine) was synthesized as described (Peng *et al.*, 1996). Details about chemical and photometrical properties can be found in the literature (Peng *et al.*, 1996; Peng & Goeldner, 1998; Specht *et al.*, 2001). The inhibition constant of CC for TcAChE was determined to be 29 μM (data not

shown). The CC absorbs at 257, 287 and 358 nm, while after UV-induced photodissociation, the free nitro-phenyl-(trifluoro)ethyl (NPE) cage absorbs at 320 nm. Photocleavage of CC in the *TcAChE* mother liquor solution can be monitored by the decrease in the level of the CC and the increase in that of the free NPE cage, both directly proportional to the release of arsenocholine. When the CC is complexed with the crystalline enzyme, however, absorption of the latter at 280 nm forbids to follow the disappearance of the uncleaved CC and only the appearance of the free cage at 320 nm can be monitored.

Crystallization of TcAChE, choice of crystal form and soaking procedure

TcAChE was purified as described (Sussman *et al.*, 1988, Raves, 1998). Orthorhombic (space group $P2_12_12_1$ – Greenblatt *et al.*, 2004) and trigonal (space group $P3_121$ – Sussman *et al.*, 1991) crystals of native *TcAChE* were obtained at 4°C by the hanging-drop vapour-diffusion method, employing polyethyleneglycol 200 (PEG200) as precipitant. The mother liquor was 32% PEG200/0.15 M morpholinoethylsulfonic acid (MES), pH 5.8-6.2, and a protein concentration of 11.5 mg/ml was employed. Orthorhombic *TcAChE* crystals grow as thin plates (typically 150x150x50 μm^3), whereas trigonal ones are more cubic-shaped (typically 150x150x100 μm^3). Hence, to maximize UV-light transmission across crystalline *TcAChE*/CC complexes, the orthorhombic crystal form was preferred over the trigonal one. To form the *TcAChE*/CC complexes, orthorhombic crystals were soaked in the dark for 12 hours at 4°C, in a mother liquor solution containing 5 mM CC, pH 6.0. Crystals were washed for 10 seconds in a mother liquor solution containing no CC before being flash-cooled at 100 K in a nitrogen gas stream. Due to the cryoprotective capacity of PEG200, no cryoprotection of the crystals was needed.

Our kinetic crystallography approach implies the use of a UV-laser (see Figure 2) to trigger *in-cristallo* the photodissociation of the CC complexed with *TcAChE*. Since UV-light

absorption by the protein was anticipated to reduce the overall photolysis efficiency, crystals of the orthorhombic space group, which grow as thin plates, were preferred over trigonal ones for all experiments conducted on *TcAChE*/CC complexes. The issue of UV-damage at RT to native *TcAChE* was, however, addressed on a very small trigonal crystal (size $\approx 50 \times 50 \times 30 \mu\text{m}^3$), across which 266 nm light transmission was ensured.

Cryophotolysis and microspectrophotometry

All microspectrophotometric characterizations and preliminary experiments were conducted at the Cryobench laboratory (European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) / IBS - Bourgeois *et al.*, 2002), where a microspectrophotometer allows measuring UV-visible light absorption directly on protein crystals or on solutions of small volumes (Figure 3). The apparatus is composed of: i/ a one-circle goniometer, ii/ three identical confocal mirror objectives focusing/collecting UV/visible light to/from the crystal, iii/ a CCD spectrophotometer (wavelength range: 200-850 nm - 2.3 nm resolution, Ocean Optics) iv/ an observation microscope (Olympus) connected to a high resolution camera (Olympus) permitting to observe and centre the crystal, and v/ a cryo-cooling device (Oxford Cryosystems) that allows to flash-cool the crystal and subsequently apply various temperature profiles. Two of the objectives are aligned for transmission mode while the third one is at 90° and is used to focus a 266 nm laser (2 mW passively q-switched YAG laser - Nanolase) onto the crystal. The laser and a Xe/halogen lamp (Micropack Xe/halogen lamp – Ocean Optics) were connected to the focusing objectives using optical fibres of 600 and 100 μm diameter (Spectraline), respectively, while optical fibres of 200 μm diameter were used to guide the light from the receiving objective to the spectrophotometer. Spectra were recorded and analysed on a PC, using the OIbase32 software (Ocean Optics). Further details on the cryobench laboratory can be found in the reference paper (Bourgeois *et al.*, 2002) or at :

<http://www.esrf.fr/UsersAndScience/Experiments/MX/Cryobench/>.

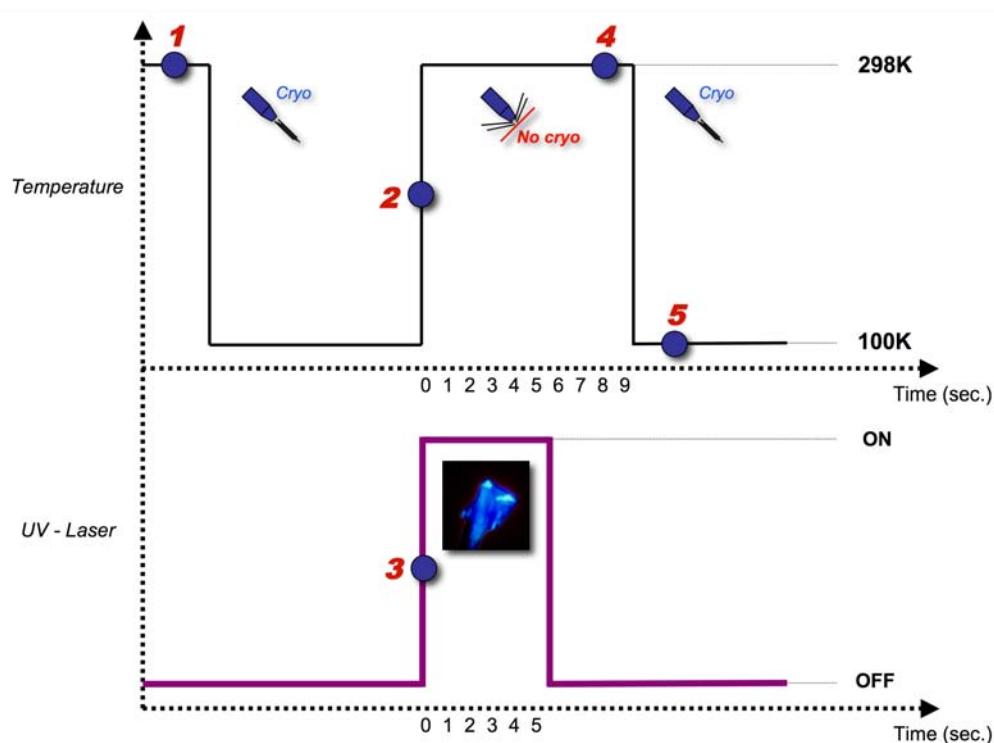


Figure 2: Temperature-controlled protein crystallography, combined with photolysis of caged-compounds, as a new approach in kinetic crystallography. The caged arsenocholine (*i.e.* a photolabile precursor of arsenocholine) binds to the crystalline enzyme at room temperature (1), and the crystal is then flash-cooled to 100 K in a gaseous nitrogen stream. The crystal is then subjected to a transient “annealing to room-temperature” (2), while at the same time the photodissociation of the caged arsenocholine into a free cage and arsenocholine is induced by its exposure to the beam of a UV laser (3). Various relaxation times at room-temperature are allowed, after laser extinction (4). Snapshots of AChE in the action of expelling the product choline are then possibly obtained, which can be characterised by X-ray crystallography at 100 K (5).

To minimize ambient light exposures that could have led to a small but unquantifiable photolysis of the CC, the cryobench laboratory was lit by a sodium lamp during all experiments. The experiments presented in Figure 4A and 4B were performed after flashcooling at 100 K, in a cryoloop of 400-500 μm , a mother liquor solution containing 5 mM of CC, pH 6.0. Figure 4A shows the absorption spectrum of the CC at 100 K, prior to photolysis, while Figure 4B shows six difference spectra obtained after 60, 120, 180, 240, 300

and 360 seconds exposure to the 266 nm laser at the same temperature; the last difference spectrum was obtained after annealing the crystal to room temperature for 5 seconds, without UV exposure. The cryoloop was rotated during laser exposures, and difference spectra were recorded at the same orientation. The experiment presented in Figure 4C was performed on an orthorhombic *TcAChE* crystal soaked in the dark, at 4°C and during 12 hours, into a 5mM CC mother liquor solution, pH 6.0. The crystal was washed for 10 seconds in a mother liquor solution containing no CC before being loop-mounted and subsequently flash-cooled at 100 K in a nitrogen gas stream. Figure 4C shows difference absorption spectra recorded at 100 K, across the crystal, after 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 seconds exposure to the 266 nm laser. To maximize the photolysis efficiency, the crystal was rotated during laser exposures, but all spectra were recorded at the same crystal orientation. Figure 4D shows an estimation of the 266 nm light transmission across orthorhombic *TcAChE* crystals. The concentrations of the crystalline enzyme in the trigonal and orthorhombic space groups were calculated to be 5.1 and 9.4 mM, respectively, and the extinction coefficient values of aromatic residues (Trp, Tyr and Phe) at 266 nm were obtained from <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/index.html>. Figure 4 was produced using the software PLOT (<http://plot.micw.eu/>).

X-ray data collection

Structure of the unphotolysed TcAChE/CC complex (structure 1)

An orthorhombic crystal (size $\approx 150 \times 150 \times 50 \mu\text{m}^3$) was mounted in a cryo-loop and directly flash-cooled in a nitrogen (N_2) gas stream at 100 K. Data for this structure (2.3 Å resolution) were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) on beamline BM30A (CRG FIP). To minimize ambient light exposure, the experimental hutch was lit by a sodium lamp during the experiment. The X-ray data set was indexed, merged and scaled using

XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV (Kabsch, 1993). This structure is referred to as structure **1** throughout the manuscript. For details see Table I.

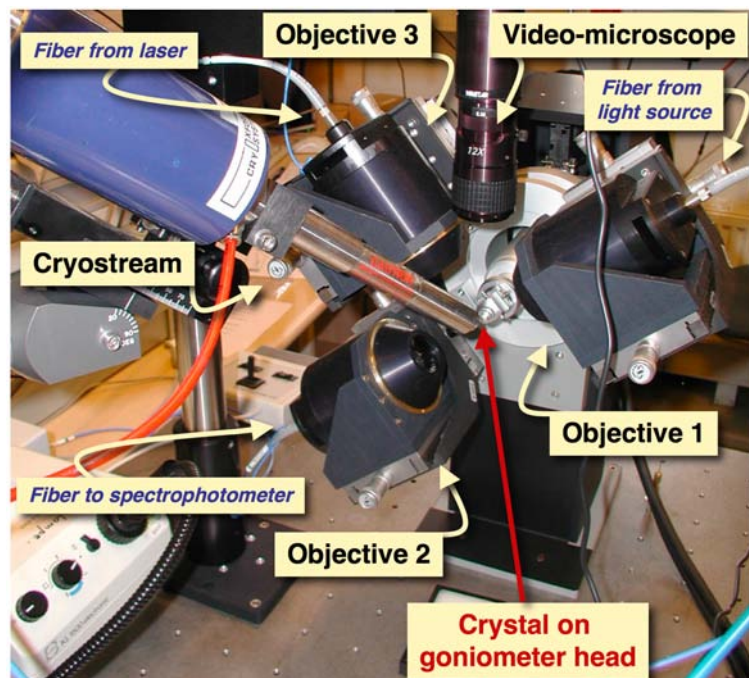


Figure 3: Microspectro-photometer at the cryobench, allowing to photocleave caged-compounds and to measure UV-visible absorption spectra of protein crystals.

Annealing to Room-Temperature (ART) procedure

To evaluate the accessible time-range for ART procedures, preliminary experiments were conducted on an in-house Rigaku R-Axis IV diffractometer using native *TcAChE* crystals. Crystals were mounted in a cryo-loop and flash-cooled in a N₂ gas stream at 100 K. A first diffraction image was collected, and ART was carried out by blocking the N₂ gas stream with a card for 1 to 60 seconds. After ART, another diffraction image was collected and the diffraction limit compared to that of the first image. Accessible time-ranges for ART procedures, *i.e.* during which no loss in the diffraction limit was observed, were evaluated to 4-45 seconds for the orthorhombic crystal form, and to 7-30 seconds for the trigonal one.

*Effect of ART on the structure of the unphotolysed *TcAChE*/CC complex (structure 2)*

The effect of ART on the structure of the unphotolysed TcAChE/CC complex was investigated on an orthorhombic crystal (size $\approx 150 \times 150 \times 50 \mu\text{m}^3$). The data were collected at the ESRF beamline ID14-EH4; the experimental hutche being lit by a sodium lamp during the experiment. The crystal was mounted in a cryo-loop and directly flash-cooled in a N₂ gas stream at 100 K. Subsequently it underwent an ART of 9 seconds, before being re-flash-cooled at 100 K for data collection (2.4 Å resolution). The data set was indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV. This structure is referred to as structure **2** throughout the manuscript. For details see Table I.

UV-damage at RT to a native TcAChE crystal (structure 3)

Since our experimental approach implies the use of a 266 nm laser to photodissociate the CC (see Figure 2), a control was needed to discriminate between the structural changes due to UV damage at RT and those related to the exit of the CC photolysis products from the active-site gorge of the enzyme. To ensure a full penetration of the 266 nm light, a very small trigonal crystal ($\approx 50 \times 50 \times 30 \mu\text{m}^3$) was mounted in a cryoloop and flash-cooled in a N₂ gas stream at 100 K. The laser lighting and the beginning of the ART procedure were synchronised. The crystal manually was brought to RT for 20 seconds, during which laser irradiation (266 nm) took place (20 seconds), before being re-flashcooled at 100 K for data collection (3.2 Å resolution). The crystal was rotated during the laser exposure. The X-ray data set was indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV. This structure is referred to as structure **3** throughout the manuscript. For details see Table I.

Structure of the photolysed TcAChE/CC complex after ART (structure 4)

A schematic representation of the experimental procedure is shown in Figure 2. The experiment was carried out at the ESRF beamline ID14-EH4. To minimize ambient light exposure, the experimental hutch was lit by a sodium lamp during the experiment. An orthorhombic crystal was mounted in a cryo-loop and flash-cooled in a N₂ gas stream at 100 K. The size of the crystal was $\approx 100 \times 100 \times 30 \text{ }\mu\text{m}^3$. Photolysis of the CC complexed within crystalline *TcAChE* was achieved by the use of a 266 nm laser (2 mW passively q-switched YAG laser – Nanolase) connected, by a 600 μm optic fiber (Spectraline), to the focusing lens of an online microspectrophotometer centered on the crystal (spot size: 150 μm) (Nanao & Ravelli, 2006; Ravelli, Murray, McGeehan, Owen, Cipriani, Theveneau, Weik & Garman, manuscript in preparation). The laser lighting and the start of the ART procedure were synchronised manually. The crystal was manually brought to RT for 9 seconds, during the first 5 seconds of which it was exposed to the laser beam, before being re-flashcooled at 100 K for data collection (3 Å resolution); hence, a 4 seconds relaxation time at RT was allowed after the extinction of the laser. The crystal was rotated during laser exposure. The data set was indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV. This structure is referred to as structure **4** throughout the manuscript. For details see Table I.

Structure determination and refinement

TcAChE/CC complexes

The native structure of *TcAChE* in the orthorhombic space group (PDB entry code 1W75 – Greenblatt *et al.*, 2004), without sugar and water molecules, was used as the starting model for rigid body refinement of the three *TcAChE/CC* complexes (structures **1**, **2** and **4**) in the resolution range of 20–4 Å. Subsequently, all data sets underwent 250 steps of conjugate-gradient minimization. Diffraction data from 20 Å to the highest resolution limits were used

for refinement and electron-density map calculations. Graphic operations, modelling and model building were performed with COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Energy minimization and individual (structures **1** & **2**) or grouped (structure **4** – for each residue, one group for main chain atoms and another for side chains atoms; for each CC or sugar molecule, one group) B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinement and map calculations were performed using CNS version 1.1 (Brünger *et al.*, 1998), and the REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) and FFT modules of the CCP4 suite (CCP4, 1994). In order to compute the $F_o - F_c$ omit map of the unphotolysed *TcAChE*/CC complex, 10 cycles of energy minimization were performed after omitting the CC from the model. Figures 5-6 were produced using PyMOL (DeLano, 2002), with the exception of Figure 6C, which was produced using ESCET (Schneider, 2000). Molecular volumes of the active site gorge in all *TcAChE*/CC structures were calculated using CASTp/GPSS (Binkowski *et al.*, 2003), with a probe radius of 1.4 Å, and are shown in Table II-A. Error-scaled difference distance matrices were produced using ESCET. Molecular topologies and parameters of the CC molecules were created using XPLO2D (Kleywegt, 1995). Qualities of the structures were checked and validated using PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) of the CCP4 suite. Refinement statistics are shown in Table I.

In the case of structures **1** and **2**, the localization and attribution of the CC molecules was rather easy, as very good-quality initial electron-density maps were obtained. For each of the two monomers (A and B) of the asymmetric unit, two CC molecules could be assigned, with occupancies of 1, one in the active and one at the peripheral site. Moreover, the strong anomalous signals of the As atoms permitted to univocally attribute the position of the arsenocholine moiety of the CC molecules (anomalous peaks of height $> 17\sigma$ at both binding loci, in structures **1** and **2**). CNS composite $2F_o - F_c$ omit maps were calculated, which served as the basis for the first step of manual rebuilding. Atoms lacking density in this map were not

included in the initial model, and were reattributed afterwards only if subsequent F_o-F_c electron density maps displayed peaks $> 3\sigma$.

Refinement was less straightforward in the case of structure **4**, given the lower quality of the initial electron density maps and the absence of a significant anomalous signal (maximum peak height: 4.2σ). An $F_o^4-F_o^2$ difference electron density map, computed using phases calculated from the model of structure **2**, displayed strong negative ($< -5\sigma$) peaks on the As atoms of the arsenocholine moiety of the CC molecules, at both the peripheral and active site of the two monomers. To estimate the post-photolysis occupancies of the CC molecules in structure **4**, the coordinates of the CC molecules in structure **2** were inserted into the model, with occupancies of 1, and energy minimization and grouped B-factor refinement were performed. The resulting F_o-F_c electron-density map displayed strong negative peaks, on both the cage and the arsenocholine moiety of the CC molecules, at both the peripheral and the active site of the two monomers. Also, the B-factor values of the CC molecules increased to up to twice their initial values. For this reason, B-factors of the CC molecules were afterwards restrained to be at a maximum 30% higher than that of a neighbouring residue, *i.e.* Trp279, at the peripheral site, and Trp84, in the active site, and their occupancies were gradually decreased, until negative peaks disappeared in subsequent F_o-F_c maps. The occupancies of the CC molecules in the final model were thereby fixed to 0.5, for all four CC molecules in the asymmetric unit. A CNS composite $2F_o-F_c$ omit map was also calculated, which served as the basis for the first step of manual rebuilding of the protein. Atoms lacking density in this map were not included in the initial model, and were reattributed afterwards only if subsequent F_o-F_c electron density maps displayed positive peaks $> 3\sigma$.

UV-damaged native TcAChE

The native structure of *TcAChE* in the trigonal space group (PDB entry code 1EA5) was used as a starting model for the rigid body refinement, in the resolution range of 20-4 Å. 250 steps of conjugate-gradient minimization were subsequently performed. Minor structural adjustments were performed with COOT. Energy minimization and grouped B-factor refinement (as defined in 2.5.1) using diffraction data from 20 to 3.2 Å followed each step of manual rebuilding. Refinement and map calculation were performed using CNS version 1.1. Refinement statistics are shown in Table I. The quality of the structure was checked and validated using PROCHECK. The effect of UV-irradiation on native *TcAChE* was evaluated by computing an error-scaled difference distance matrix between this structure and that refined from a native crystal (**N**), annealed to RT for 20 seconds but without laser exposure (data not shown). Molecular volumes of the active site gorge in structures **3** and **N** were calculated using CASTp/GPSS, with a probe radius of 1.4 Å, and are shown in Table II-B.

Results

Spectral characterisation of the CC and of the TcAChE/CC crystals

The CC is a photocholinergic ligand. When soaked at 5 mM into the *TcAChE* mother liquor solution, it displays three absorption peaks at 257, 287 and 358 nm, respectively (Figure 4A), while the mother liquor solution does not absorb in the UV domain (not shown). The CC is photocleaved following its exposure to a 266 nm laser, even at a temperature as low as 100 K; yet, the photolysis process reaches completion only after an ART procedure (Figure 4B). Photolysis of the CC by means of the 266 nm laser can also be achieved within crystalline *TcAChE* (Figure 4C). A minimum optical length is however advised to reduce UV-light absorption by the protein (Figure 4D), and hence maximize photolysis efficiency. It should be noted that a spectral signature of CC photolysis can also be obtained using a 355 nm laser (Specht *et al.*, 2001), thereby limiting light absorption by the crystal. Also, and as it shall be

noted in the following, the same structural results can be obtained after triggering the photodissociation of the CC with either a 266 or a 355 nm laser. However, because the CC is cleaved by absorbing light at 257 nm, and since sufficiently thin orthorhombic crystals were available, the 266 nm laser was preferred over the 355 nm one, and used in all experiments described herein.

Binding of the CC in the active site gorge of TcAChE

Two AChE molecules are found in the asymmetric unit of the orthorhombic crystal form of TcAChE; they form a dimer, in which the monomers are linked by a four-helix bundle (Greenblatt *et al.*, 2004). In the following, the results concern both monomers unless stated otherwise.

In structure **1**, two CC molecules could be assigned with occupancies of 1, in the active site and at the peripheral site (Figure 5A). The use of caged-arsenocholine, instead of caged-choline, allowed to easily locate the As atoms, by virtue of the very clear anomalous signal (K α absorption edge of As is at 11.8 keV *i.e.* 1.05 Å) at the wavelength employed ($\lambda = 0.977$ Å). The quaternary arsenium moiety of the CC bound in the active site (Figures 5A,B) mainly interacts with Trp84, Phe330 and Glu199 (distances between the two closest non-hydrogen atoms: 3.4, 3.3 and 3.0 Å, respectively), while the NPE aromatic moiety stacks between Phe330, Phe331 and Tyr334 side chains (distances between the two closest non-hydrogen atoms: 3.3, 3.5 and 3.2 Å, respectively). The CF₃ group of the NPE cage faces the acyl-pocket, *i.e.* Trp233, Phe288 and Phe290, hence mimicking the methyl moiety of the substrate. A similar binding of a CF₃ group in the acyl-pocket was also observed in the structure of TcAChE with the transition state analogue TMTFA (Harel *et al.*, 1996). Apart from small rotations (<10°) undergone by Phe330 and Phe331 side chains, no conformational changes are observed in the active site upon binding of this molecule.

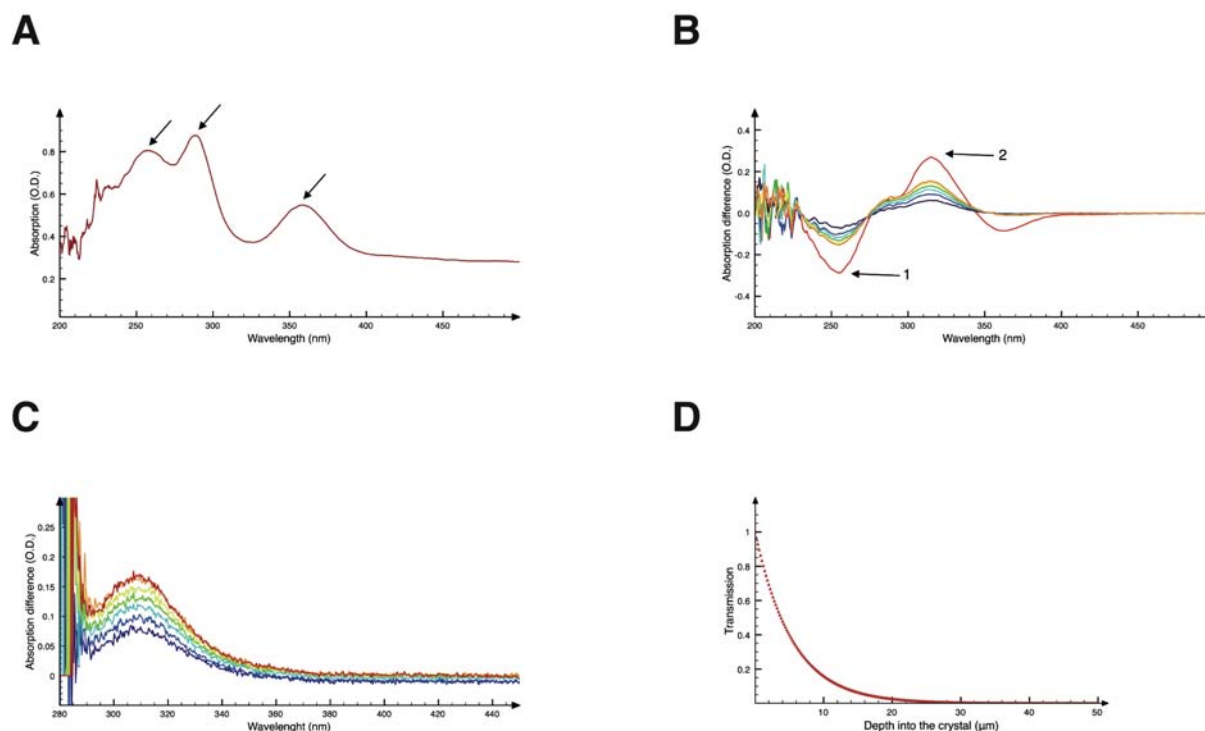


Figure 4: (A) Absorption spectrum of nitro-ortho-(tri-fluoro)ethyl arseno-choline (CC) in the *TcAChE* mother liquor solution. Absorption peaks are at 257, 287 and 358 nm (arrows). (B) Photolysis of CC in the mother liquor solution. Difference OD spectra were recorded at 100 K after 60, 120, 180, 240, 300 and 360 seconds (cold to warm colours) exposure to the 266 nm laser. The last difference spectrum (in red) was obtained after annealing the crystal to RT for 5 seconds without UV exposure; it clearly shows that the photolysis process is not complete at 100 K. The first arrow (1) shows the decrease in the absorption of the CC at 257 nm, while the second arrow (2) shows the increase in that of the free NPE-cage at 320 nm (C) *In-crystallo* photolysis of CC. Difference OD spectra were recorded at 100 K, across orthorhombic *TcAChE*/CC crystals, after 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 seconds (cold to warm colours) exposure to a 266 nm laser. (D) 266 nm light transmission across an orthorhombic *TcAChE* crystal.

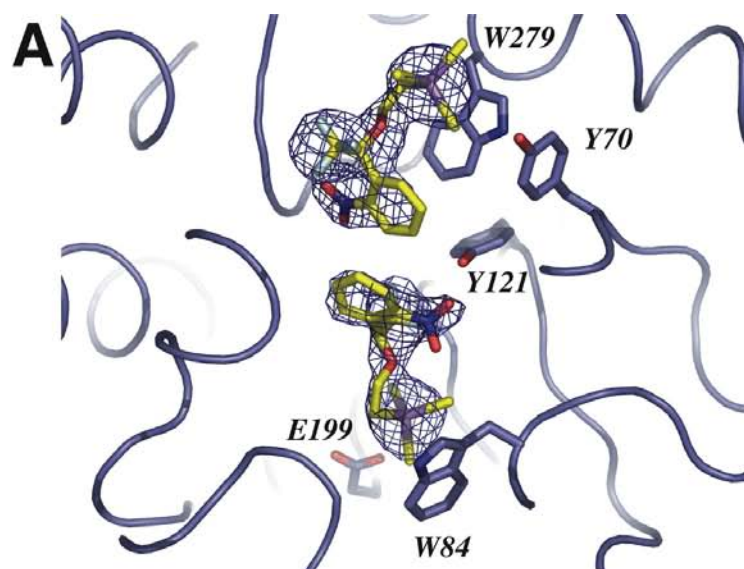


Figure 5A: Binding of caged-arsenocholine molecules in the *TcAChE/CC* un-photolysed complex (structure 1). The major constituents of the peripheral site (Tyr70, Tyr121 and Trp279) and of the active site (Trp84 and Glu199) are shown. The Fo-Fc electron density map (contour level 3.5σ), computed without the atomic coordinates of CC, is superimposed on the model.

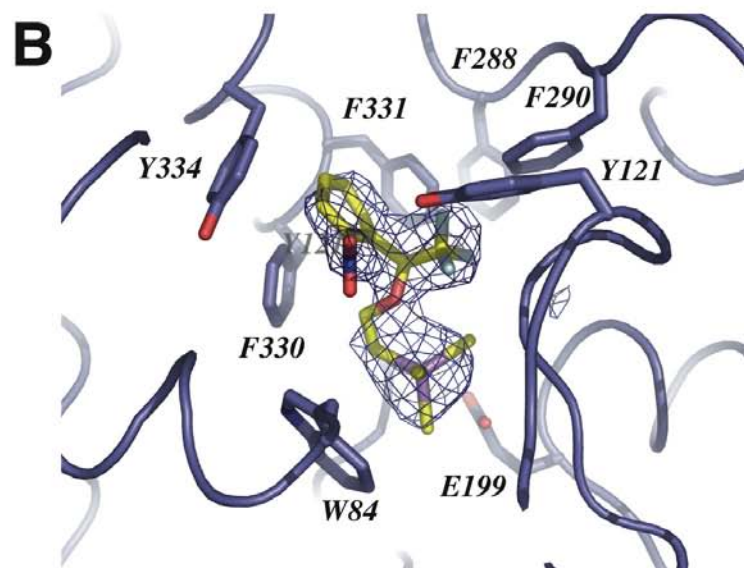


Figure 5B: Binding of CC in the active site; The active site residues Trp84, Glu199, Ser200 and Phe330 are shown, as well as three out of the four constituents of the “acyl-pocket” (Phe288, Phe290 and Phe331; Trp233 not shown) and Tyr334. The Fo-Fc electron density map (contour level 3.5σ), computed without the atomic coordinates of CC, is superimposed on the model.

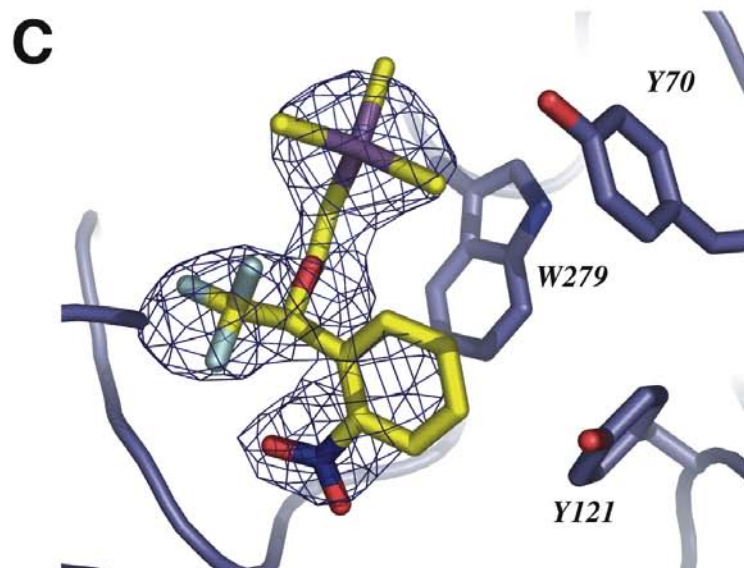


Figure 5C: Binding of CC at the peripheral site. The peripheral site residues (Tyr70, Tyr121 and Trp279) are shown. The Fo-Fc electron density map (contour level 3.5σ), computed without the atomic coordinates of CC, is superimposed on the model.

At the peripheral site, the CC molecule is found “upside-down” (Figures 5A,C) with respect to the orientation of the CC molecule bound in the active site; hence the two aromatic NPE-cages of the molecules bound in the active and at the peripheral sites interact *via* hydrophobic stacking (distance between the two closest non-hydrogen atoms of their respective aromatic cycles: 3.2 Å). The arsenocholine moiety of the CC molecule at the peripheral site points toward the bulk, and is mainly stabilized by cation- π interactions with Tyr70 and Trp279 (distances between the two closest non-hydrogen atoms: 3.5 and 3.4 Å, respectively). The aromatic NPE cage binds within the gorge, with the CF₃ group in the vicinity of Tyr334-Gly335 main chain atoms (distances between each F atom and the closest non-hydrogen atom: 3.01, 3.04 and 3.12 Å, respectively). The two oxygen atoms of the nitroso group are at H-bonding distance from Phe288 main chain nitrogen (distances: 2.6 and 2.9 Å). Upon binding of the CC molecule at the peripheral site, the side chain of Tyr70 undergoes a $\approx 20^\circ$ rotation towards the bulk. The rmsd between this structure and the native structure (PDB entry 1W75) is 0.351 Å.

Effects of ART and of UV-exposure at RT on TcAChE crystals

Our experimental approach implies the use of a 266 nm laser to photodissociate the CC, and ART procedures to allow the enzyme expelling the photolysis products (Figure 2). Hence, two main controls were needed: i/ one that addresses the issue of structural changes that could be induced by the ART procedure, and ii/ another one to discriminate between the conformational changes due to UV damage and those related to the exit of the photolysis products from the active site of the enzyme.

ART-procedure effects on TcAChE/CC structure were investigated by comparing the unphotolysed structures collected either directly after the flash-cooling of a crystal to 100 K (structure **1**) or after a 9 seconds ART (structure **2**). The two structures are very similar. An

error-scaled difference distance matrix (ESDDM – Schneider, 2000) was computed between structure **1** and structure **2**, which is essentially featureless (Figure 6C, upper part). Refinement of structure **2** yielded a higher R_{free} value, though only a small loss in the diffraction quality was observed with respect to structure **1** (see Table I). The two CC molecules are found at the same loci and still display occupancies of 1, and the gorge volume does not change upon the ART procedure (Table II-A). Peaks > 17 σ are seen in the anomalous map on each As atoms of the asymmetric unit in structure **2**, as in structure **1**. The B-factor values of both the protein and the CC atoms are also very similar in structure **1** and structure **2**. The rmsd between these two structures is 0.270 Å, and that between structure **2** and the native structure is 0.376 Å.

In order to investigate the effect of UV exposure at RT on TcAChE, a trigonal crystal was flash-cooled to 100 K in the nitrogen gas stream, and then brought to RT for 20 seconds, during which it was exposed to the 266 nm laser beam (structure **3** - see Materials and Methods section). An ESDDM was calculated between structures **3** and **N**, which showed that no significant structural change occurs upon 20 seconds UV irradiation at RT (not shown). This was further confirmed by active site gorge volume calculations, which indeed yielded a similar value for structures **3** and **N**(Table II-B).

Expulsion of CC photolysis-products at RT by TcAChE

Data for this structure (structure **4**) were collected following the flash-cooling of the crystal at 100 K and a 9 seconds ART, during the first 5 seconds of which it was exposed to the 266 nm laser (see Figure 2 and the Material and Methods section). The F_o⁴-F_o² difference electron-density map (Rmerge between the two datasets: 27 %) yielded strong negative peaks (only peaks of absolute values > 5 σ were considered as significant) on the As atoms of the CC, at both the active and the peripheral site (Figure 6A – shown for monomer B), indicating that at

least a fraction of the photo-freed arsenocholines had exited the enzyme upon laser irradiation at RT. The occupancies of the CC molecules were refined to 0.5 at both the active and the peripheral site; indeed, when their occupancies were kept at 1, strong negative peaks appeared in the subsequent $F_o - F_c$ difference electron-density map (Figure 6B – shown for monomer B). The decrease in the occupancies of the CC molecules in structure **4**, and their increased agitation with respect to structure **2**, was further confirmed by the weakness of the anomalous signal of their arsenocholine moiety; indeed, only a very small peak in the active site of monomer A is seen when the anomalous map is displayed at 4σ (not shown). Hence, we conclude that about 50 % of the photolysis products have been expelled from the active site of the protein. Due to the lack of significant anomalous signal and since no positive peaks $> 4\sigma$ were found in the $F_o^4 - F_o^2$ difference electron-density map, no information was obtained about choline binding sites other than those already described, *i.e.* in the active site and at the peripheral site (Colletier *et al.*, 2006b). It must be noted, however, that orthorhombic *TcAChE* crystals are not very isomorphous (Rmerge values of 15-60 %); hence $F_o - F_c$ difference maps give information only on large differences between data sets, *viz.* the depletion of strongly diffracting atoms from the active site gorge of the enzyme.

Regarding to the protein structure itself, side chain atoms of numerous surface-residues were not included into the model since no density was observed for them, neither in the $2F_o - F_c$ omit map displayed at 1σ , nor in $F_o - F_c$ difference maps displayed at 3σ (see Materials and Methods section). The rmsd between structure **4** and structure **1** is 0.531 Å, while that between structure **4** and structure **2** is 0.519 Å (rmsd between structure **4** and the native structure: 0.567 Å). The structural dissimilarities between the photolysed structure (structure **4**) and the unphotolysed ones (structures **1** and **2**) were more striking in monomer B than in monomer A, hence in the following, we limit our analysis to the former. An ESDDM was calculated between structures **2** and **4**, and compared to that calculated between structures **1** and **2**

(Figure 6C – shown for monomer B). In such matrices, positive peaks (in red) indicate an increased distance between C α atoms of the compared structures, and vice versa for negative peaks (in blue). The ESDDM computed between structures **1** and **2** confirms that the two structures are very similar; that computed between structures **2** and **4** indicates, on the other hand, a clear tendency of the protein to expand upon photolysis at room-temperature. Indeed, two domains of the enzyme, constituted by residues 4-270 and 271-535, move away from each other (Figure 6C - shown for monomer B) ; these two domains are on both sides of the active site gorge (Figure 6D). Upon exit of the photolysis products, the volume of the active site gorge of monomer B increases by 25 % (10 % in monomer A), being 939Å³ in structure **2** and 1159Å³ in structure **4**, to compare with a value of 904 Å³ in the native orthorhombic structure (Table II-A).

The global architecture of the active site gorge is conserved in structure **4**, with respect to structures **1** and **2**, yet some residues undergo more significant side chain rotations or backbone movements than on average. Most residues constitutive of the active-site gorge wall display small backbone movements (not more than a few tenths of an Å); with respect to structure **2**, the most important backbone deviations concern residues 114-120, 123-128, 336-348 and 437-448, respectively. Small side chains deviations are observed for quite a lot of residues, yet, inside the gorge, striking are only those of Tyr70, Trp84, Tyr114, Leu127, Val129, Tyr130, Glu199, Phe288, Phe330 and Tyr442, which move away from the centre of the gorge (Figure 6E). Noteworthy is also a 180° rotation of the Ser200 side chain, which puts in regard its O γ and the side-chain oxygen atoms of Glu199 (distances to Glu199 O ϵ 1 and O ϵ 2: 2.5 and 3.1Å, respectively), yet without disrupting the hydrogen bonding to catalytic His440 N ϵ 2 (distance: 3.1 Å).

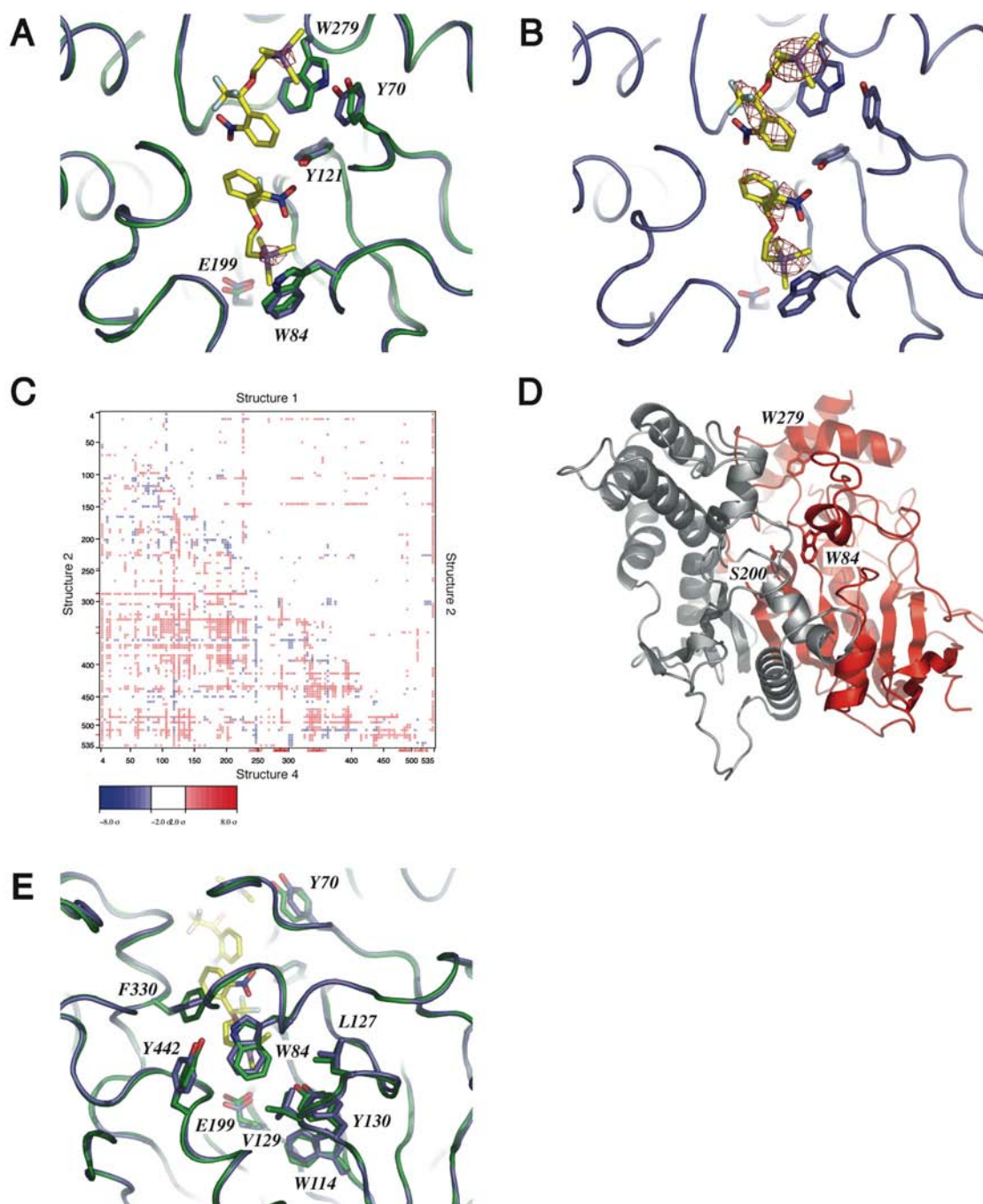


Figure 6: (A) Relative decrease in the occupancies of the CC molecules in structure **4**, with respect to structure **2** (monomer B). The C α traces of structures **2** and **4** are shown in green and blue, respectively. Residues Glu199 and Trp84, in the active site, and Tyr70, Tyr121 and Trp279, at the peripheral site, are shown for both structures. The $F_o^4 - F_o^2$ difference electron-density map is superimposed on the model (contour level -5σ). (B) Decrease in the occupancies of the CC molecules in structure **4** (monomer B). The $F_o - F_c$ difference electron density map (contour level -3σ), obtained when occupancies of the CC molecules are kept at a value of 1, is superimposed on the model. (C) Error-scaled distance difference matrix (ESDDM) between C α atoms of structures **2** and **4** (lower half) and between that of structures **1** and **2** (upper half); the ESDDM is shown for monomer B. Red and blue peaks indicate an increase and a decrease, respectively, in the distance between C α atoms (D) Three-dimensional structure of TcAChE highlighting the two domains situated on both sides of the active site gorge. In red, are shown residues 4-305, and in blue, residues 306-535. The orientation is the same than in Figure 1, and Trp84, Ser200 and Trp279 are shown. (E) Movements undergone by residues constitutive of the ammonium binding loci and of the putative backdoor (monomer B) upon laser photolysis and annealing to room-temperature (ART). The C α trace of structure **2** is shown in green, while that structure **4** is shown in blue. Residues Tyr70, Trp84, Trp114, Leu127, Val129, Tyr130, Glu199, Phe330 and Tyr442 are shown for both structures.

Discussion

Choline exit from TcAChE active site gorge

Our experimental approach was designed to structurally address the issue of choline exit from the active site of AChE and to test the backdoor hypothesis (Gilson *et al.*, 1996). Caged arsenocholine was used instead of caged choline, because the anomalous diffusion of As atoms could have help identifying putative intermediate binding-sites along choline exit pathway(s) (Peng *et al.*, 1998). The exit of arsenocholine from the active site of *TcAChE* was triggered by virtue of a UV-induced photodissociation of the CC, concomitant with a 9 seconds annealing of the crystal at room temperature (RT). At least 50 % of the two photolysis products, *i.e.* arsenocholine and the NPE-cage, were expelled from the enzyme gorge by this procedure (Figure 6A,B). Upon exit of the photolysis products, no such major conformational changes are observed as e.g. the ones found in the complex structures of *TcAChE* with either DFP (Millard *et al.*, 1999a) or gallanthamine (Greenblatt *et al.*, 2004). Yet the two domains of the enzyme, found on both parts of the active-site gorge (Morel *et al.*, 1999), slightly move away from each other (Figure 6C,D), resulting in an increase of the gorge volume in structure **4** with respect to structures **1** and **2** of ≈ 10 and 25 % in monomer A and B, respectively (Table II-A). The domain mouvement was not observed when a *TcAChE*/CC complex was annealed to RT for the same time delay without UV irradiation or when a native *TcAChE* crystal was subjected to UV irradiation at RT. Hence, the gorge expansion is directly related to the exit of the photolysis products.

No intermediate binding-sites for choline on its way out from the active site were found. In particular, no experimental evidence was obtained that could have supported the existence of an alternative exit pathway *via* a backdoor. Molecular dynamic (MD) simulations have indicated that, if such a door opens in the gorge-wall, a dipole moment would appear, pulling the positively-charged choline through the door towards the bulk (Gilson *et al.*, 1996). The

arsenocholine moiety of the CC in the active site binds with its arsenium atom pointing towards the bottom of the gorge, *i.e.* in an orientation 180 degrees rotated with respect to the one observed when choline binds in the gorge after enzymatic catalysis (Colletier *et al.*, 2006b). Therefore, arsenocholine after UV-induced photodissociation is in a favourable orientation to exit *via* the putative backdoor. Nevertheless, no sign of an open backdoor was found in structure **4**. However, since subtle motions are observed for most residues flagged in MD simulations as putatively involved in the opening of the backdoor (Trp84, Tyr130, TrpTyr442, Ile444 – Figure 6E – Gilson *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 2001), we cannot exclude that a small fraction of arsenocholine may have exited the active site *via* a backdoor. It could also be argued that backdoor opening events are likely to occur on a shorter time-scale than the one of our experiment (seconds), hence not being detectable in our approach. Furthermore, the crystal packing might hamper motions to occur that might be necessary for opening a backdoor. According to our data, the most likely hypothesis is that arsenocholine exit occurs predominantly, if not only, *via* the gorge. While back- or sidedoors still might exist, they may rather serve as alternative routes to the active site when the principal access *via* the gorge is obstructed by e.g. fasciculin binding (Marchot *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1995).

Limitations of the caged-compound approach in kinetic crystallography

X-ray protein crystallography is a unique technique in view of solving macromolecular structures. It suffers, however, from the fact that it provides the average structure of an ensemble of molecules present in the diffracting area of the crystal; hence dynamic information can usually not be assessed. Exploration of the conformational energy landscape of a protein by means of X-ray crystallography requires the use of experimental tricks, to overcome the inherently static nature of crystallographic structures. To date, most successful

kinetic crystallography studies have exploited the use of lasers to synchronously and efficiently trigger photoswitchable reactions within light-sensitive proteins, and liquid or vaporous nitrogen to cryo-trap intermediate states by flash-cooling of the crystal (reviewed by Bourgeois & Royant, 2005). Here, photodissociation of caged compounds by a 266 nm laser was employed that, in combination with a “freeze-trigger-freeze” strategy, allowed to structurally follow the exit of arsenocholine from the active site of *TcAChE*.

Our approach bears at least two principal limitations. Firstly, an NPE-based caged compound was employed that required the use of a 266 nm laser to induce photodissociation. As shown in Figure 4D, the transmission of 266 nm light across a protein crystal is very weak, owing to the enormous absorption of aromatic residues. Hence, rather thin crystals have to be used to maximize the photolysis efficiency. This might not be feasible in many cases, since the shape and size of a crystalline sample is hardly under control. Further progress using this approach will probably require the synthesis of chemically more adequate molecules, *i.e.* caged-compounds that efficiently dissociate upon laser irradiation at a wavelength far from the absorption band of aromatic residues. This would also prevent the occurrence of UV-induced radiation damage, which has been shown to affect proteins in the crystalline state (Vernede *et al.*, 2006; Nanao & Ravelli, 2006).

The second limitation of our approach relates to the *annealing to room temperature* (ART) procedure. ART of the crystals was performed to allow molecular motions of the protein, the photolysis products and the solvent to occur that might be compulsory for arsenocholine to exit the active site gorge. ART procedures demand a sufficient robustness of the crystals and a preliminary characterisation of the accessible time-range at RT. It is likely that not all crystals will display the same diffracting power after such an ART procedure, making this technique more adapted to highly diffracting crystals.

Conclusion

We have described a kinetic crystallography approach based on the combination of rationally designed caged-compounds and temperature-controlled protein crystallography. This method can be used to trigger biologically relevant reactions within crystalline samples, hence allowing to structurally follow the course of an enzymatic event, as e.g. the exit of choline in AChE. However, two issues need to be considered, the robustness and the shape and size of the crystal. Indeed, most molecular motions compulsory for the occurrence of a biological reaction will take place at room temperature. Hence, *annealing to room temperature* procedures will have to be performed, which may not be suitable for all crystals. Since most caged-compounds developed so far dissociate upon UV exposure, appropriately-shaped crystals are required to maximize the photolysis efficiency. UV-damage to the crystalline protein might occur in addition, to which particular attention should be paid. Further experiments using this approach should focus on the use of chemically more adapted molecules, *i.e.* caged compounds that display maximum absorption at a wavelength far from the absorption of aromatic residues.

Acknowledgments

We warmly thank Lily Toker for providing us with purified TcAChE. We thank Elspeth Garman, Johanne McCarthy, John McGeehan, Jérémy Ohana, Raimond Ravelli and Xavier Vernede for fruitful discussions and help during data collection. We are grateful to Didier Fournier for fruitful discussions and to Juan Fontecilla-Camps for regular access to the X-ray source of his laboratory. We thank Andrew Binkowski for help in the computation of active site gorge volumes, and James Murray for help in using ESCET. Financial support by the CEA, the CNRS and the UJF is acknowledged.

Table I : Data collection and refinement statistics:

	Unphotolysed <i>TcAChE</i> /CC complex (structure 1)	Unphotolysed <i>TcAChE</i> /CC complex after ART (structure 2)	Native UV- damaged <i>TcAChE</i> (structure 3)	Photolysed and annealed-to-RT <i>TcAChE</i> /CC complex (structure 4)
PDB accession code				
ESRF Beamline	BM30A	ID14-EH4	ID14-EH4	ID14-EH4
Temperature (K)	100	100	100	100
Oscillation Step (°)	1	1	1	1
Number of frames	150	120	100	120
Exposure time (sec/frame)	30 unatt. beam	1 5x att. beam	1 unatt. beam	1 5x att. beam
Wavelength (Å)	0.977	0.932	0.932	0.932
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 21	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters (Å)				
a	91.42	91.20	112.52	91.62
b	103.64	104.46	112.52	104.47
c	147.31	148.05	137.58	148.80
Resolution range (Å)	20.00 – 2.30 (2.40 – 2.30) ^(*)	20.00 – 2.40 (2.50 – 2.40)	20.00 – 3.3 (3.3 – 3.2)	20.00 – 3.00 (3.10 – 3.00)
Completeness (%)	98.6 (91.5)	99.8 (100)	99.5 (100)	98.6 (99.0)
R _{merge} (%) ^(#)	9.4 (37.3)	10.7 (46.7)	17.4 (58.5)	13.6 (54.9)
I/σI	14.7 (4.0)	8.4 (2.8)	22.1 (3.4)	9.2 (2.6)
Unique Reflections	61881	55871	17127	29073
Redundancy	5.74	7.29	5.94	6.12
Observations/parameters ratio	1.62	1.44	1.23	0.97
R _{cryst.} (%)	22.43	22.60	22.44	24.62
R _{free} (%)	23.54	28.17	26.63	30.04
r.m.s.d. bond length (Å)	0.007	0.007	0.009	0.013
r.m.s.d. bond angles (°)	1.335	1.326	1.415	1.604
r.m.s.d with respect to native structure (Å)	0.351	0.376	0.239	0.567

$$^{(*)} R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$$

^(*) Values in brackets are for the highest resolution shells.

Table II : (A) Molecular volume of the active site gorge in native orthorhombic *TcAChE*, as well as in structures **1**, **2** and **4**. (B) Molecular volume of the active site gorge in native trigonal *TcAChE*, as well as in structures **3** and **N**.

(A)

	Native <i>TcAChE</i>	Unphotolysed and unannealed <i>TcAChE</i> /CC complex (1)	Unphotolysed and annealed-to-RT <i>TcAChE</i> /CC complex (2)	Photolysed and annealed-to-RT <i>TcAChE</i> /CC complex (4)
Monomer A	911 Å ³	885 Å ³	899 Å ³	1002 Å ³
Monomer B	904 Å ³	925 Å ³	939 Å ³	1159 Å ³

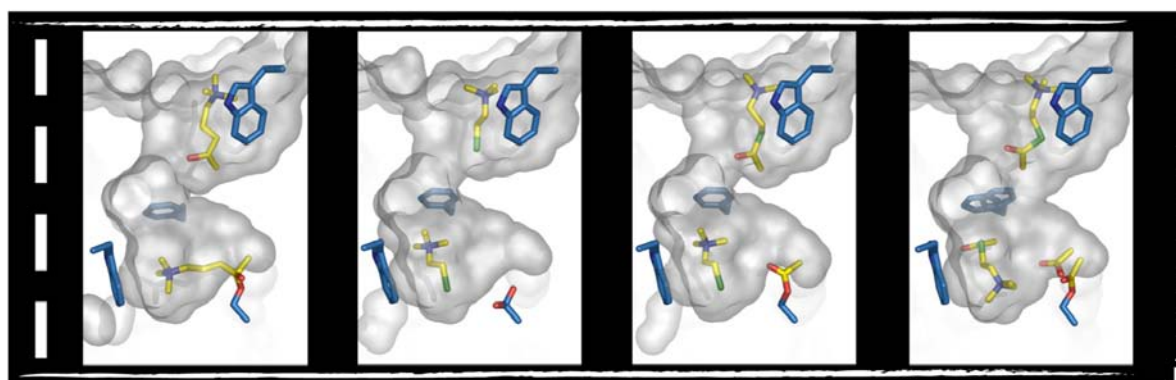
(B)

Native trigonal <i>TcAChE</i> flashcooled at 100K	Native trigonal <i>TcAChE</i> annealed to RT for 20 seconds without UV exposure (N)	Native <i>TcAChE</i> annealed to RT and exposed to the 266nm laser beam for 20 seconds (3)
908 Å ³	934 Å ³	972 Å ³

Exploration structurale du paysage conformationnel de l'acétylcholinestérase par cristallographie cinétique.

Jacques-Philippe Colletier et Martin Weik.

CEA-CNRS-UJF, Institut de Biologie Structurale J.-P. EBEL, UMR5075, Laboratoire de
Biophysique Moléculaire – 38027 Grenoble France



Colletier & Weik (2006d) *Ann. Pharm. Fr.*, sous presse.

Résumé : L'acétylcholinestérase est une enzyme très rapide, essentielle à la neurotransmission cholinergique. Elle est la cible de toutes les molécules actuellement utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, et les progrès à venir dans la modulation de son activité réclament une connaissance plus fine de sa structure et de sa dynamique. L'exploration du paysage conformationnel d'une protéine par la méthode de cristallographie aux rayons X réclame l'utilisation d'astuces expérimentales afin de dépasser la nature généralement statique des résultats obtenus. Nous présentons ici trois approches expérimentales ayant permis d'obtenir des informations structurales sur la dynamique de l'acétylcholinestérase, lesquelles sont importantes, puisque pertinentes, pour le « structure-based drug-design ».

Mots-clefs : acétylcholinestérase – paysage conformationnel – trafic de substrats et produits – cristallographie cinétique – maladie d'Alzheimer.

Summary : Acetylcholinesterase is a very rapid enzyme, essential in the process of nerve impulse transmission at cholinergic synapses. It is the target of all currently approved anti-Alzheimer drugs and further progress in the modulation of its activity requires structural as well as dynamical information. Exploration of the conformational energy landscape of a protein by means of X-ray crystallography requires the use of experimental tricks, to overcome the inherently static nature of crystallographic structures. Here we report three experimental approaches that allowed to gain structural insight into the dynamics of acetylcholinesterase, which is relevant for structure based drug-design.

Keywords : acetylcholinesterase – conformational energy landscape – traffic of substrates and products – kinetic crystallography – Alzheimer disease.

Introduction :

L'acétylcholinestérase (AChE) est une protéine exprimée dans les systèmes nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs. Si au sein du système circulatoire, son rôle physiologique reste encore à élucider, sa fonction principale, au sein du système nerveux, est parfaitement caractérisée. L'AChE est constitutive des synapses dites cholinergiques, *i.e.* qui utilisent le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement, etc). L'AChE hydrolysera à ces différents loci le neurotransmetteur ACh (Schéma 1) (Rosenberry, 1975), terminant ainsi la transmission de l'influx nerveux et restaurant, de fait, l'excitabilité de ces synapses. De sa vitesse d'hydrolyse dépend donc la rapidité de transmission de l'influx nerveux ; en accord avec cette fonction, l'AChE est parmi les enzymes les plus rapides de la Nature, avec un turn-over de 1000 à 20000 molécules par seconde, selon l'espèce considérée.

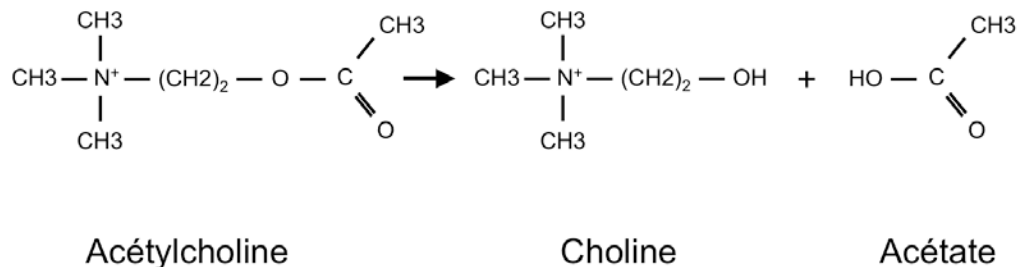


Schéma 1 : Réaction d'hydrolyse de l'ACh catalysée par l'AChE – *Hydrolysis of ACh, as catalysed by AChE.*

L'AChE est la cible de nombreux toxiques naturels et synthétiques, parmi lesquels la fasciculine, un peptide extrait du venin des serpents Mamba (Marchot *et al.*, 1993 ; Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Kryger *et al.*, 2000), certains alcaloïdes, comme l'huperzine (Raves *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2003) ou la galanthamine (Greenblatt *et al.*, 2004), et les

organophosphorés, de type neurotoxique ou insecticide. L'AChE est la cible de la première génération de médicaments anti-Alzheimer (Greenblatt *et al.*, 2003), ainsi que d'autres drogues utilisées dans le traitement de la myasthénie et de divers désordres neuromusculaires. La compréhension détaillée du mode de fonctionnement de cette enzyme, de sa structure et de la dynamique associée à celle-ci, est donc capitale, tant d'un point de vue toxicologique que clinique.

La première structure tridimensionnelle d'une AChE, celle du poisson torpille *Torpedo californica* (TcAChE), a été résolue en 1991 par Sussman et coll. (Sussman *et al.*, 1991). Elle a révélé l'enfouissement du site actif au fond d'une gorge profonde (env. 15 Å) et étroite (env. 5 Å à mi-hauteur). Cette gorge, tapissée de nombreux résidus aromatiques, est surmontée d'un site périphérique probablement responsable de la pré-orientation du substrat avant sa glisse vers le site actif (Figure 1). Les alignements de séquence, puis la résolution des structures des AChEs de souris (mouse AChE ou mAChE) (Bourne *et al.*, 1995 ; Bourne *et al.*, 1999), de *Drosophile* (*Drosophila melanogaster* AChE ou DmAChE) (Harel *et al.*, 2000) et humaine (human AChE ou huAChE) (Kryger *et al.*, 2000) ont montré que cette architecture était conservée au sein de cette famille d'enzymes.

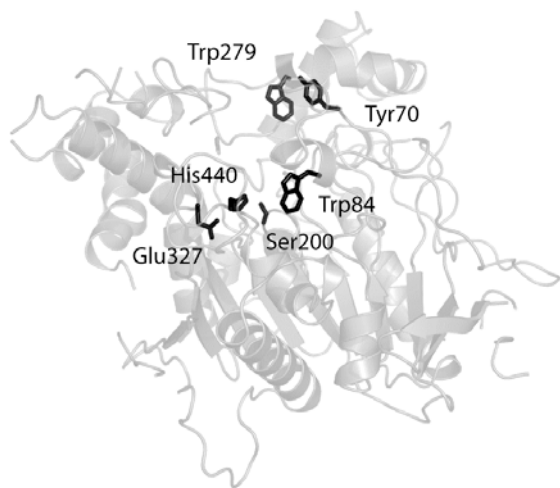


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la TcAChE montrant la triade catalytique (Ser200, His440, Glu327), le principal contributeur à la stabilisation de l'ACh dans le site actif (Trp84), et les deux principaux constituants du site périphérique (Trp279, Tyr70) (PDB id. : 1EA5). *Three-dimensional structure of TcAChE highlighting the catalytic triad (Ser200, His440, Glu327), the main contributor to the stabilisation of ACh in the active site (Trp84), and the two principal constituents of the peripheral site (Trp279, Tyr70).*

La localisation enfouie du site actif a soulevé une multitude d'interrogations quant aux bases structurales et dynamiques de l'efficacité catalytique de l'AChE. Il est en effet contre-intuitif, voire paradoxal, qu'une enzyme puisse être aussi rapide avec un site actif si peu accessible. Une *respiration moléculaire*, autorisant des mouvements de large amplitude autour de la gorge, semble nécessaire pour que le trafic de substrats et de produits puisse avoir lieu. Ces mouvements correspondent à des transitions entre différents sous-états dans le très complexe paysage conformationnel de l'enzyme (Frauenfelder *et al.*, 1991). Des simulations de dynamique moléculaire ont par ailleurs suggéré l'existence d'une porte de sortie annexe à la gorge pour la choline, un des deux produits de la réaction d'hydrolyse. À ce jour cependant, aucune preuve expérimentale n'a été apportée concernant la possible survenue de mouvements de large amplitude autour de la gorge, ou l'existence d'une porte annexe de sortie pour le produit choline.

Afin de lever le voile sur la dynamique de cette enzyme au cours de la catalyse, nous avons tenté l'exploration de son paysage conformationnel par la méthode de cristallographie aux rayons X. Cette méthode puissante permet d'obtenir la structure des macromolécules biologiques, mais ne fournit généralement pas d'informations sur la dynamique de ces objets. Pourtant, leur fonction biologique réclame à l'évidence que leur structure soit animée par une multitude de mouvements, de petite comme de large amplitude. Pour obtenir une information dynamique par la méthode de cristallographie aux rayons X, des astuces expérimentales ou des développements instrumentaux seront nécessaires, dont nous donnerons trois exemples dans les lignes qui suivent.

Avantage fut pris, dans un premier temps, de la faculté d'un ligand à sélectionner une conformation particulière de l'enzyme. La résolution de la structure du complexe de l'AChE avec un putatif médicament anti-Alzheimer de seconde génération, le NF595 (Savini *et al.*, 2003), a révélé une réorganisation majeure du site périphérique de l'enzyme (Colletier *et al.*,

2006a). Ce site est responsable, au cours du développement de la maladie d'Alzheimer, de l'induction de la formation des plaques amyloïdes (Inestrosa *et al.*, 1996) ; sa déstructuration pourrait donc avoir un effet clinique bénéfique.

Dans un second temps, nous avons caractérisé structuralement les états intermédiaires impliqués dans le trafic des substrats et produits au sein de l'AChE. La résolution de la structure de l'AChE en complexe avec un analogue de substrat non-hydrolysable, le 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium (OTMA), a permis la caractérisation de la structure pré-productive de l'enzyme, *i.e.* celle formée juste avant la catalyse. L'AChE est, par ailleurs, inhibée par les hautes concentrations de son propre substrat. Grâce à des trempages des cristaux à différentes concentrations d'un substrat modifié, l'acétylthiocholine (ATCh), nous avons pu caractériser deux complexes différents de l'enzyme avec son substrat et soit un, soit deux de ses produits. Prises conjointement, ces structures permettent une description détaillée du trafic des substrats et produits au sein de cette enzyme. Elles révèlent, par ailleurs, les bases structurales du phénomène d'inhibition par le substrat (Colletier *et al.*, 2006b).

Nous proposerons, enfin, une stratégie nouvelle en cristallographie cinétique des protéines. Celle-ci a été développée en vue d'élucider par quel chemin la choline est expulsée du site actif de l'AChE. Cette approche combine l'utilisation d'un précurseur photosensible de la choline (Peng *et al.*, 1996 ; Peng & Goeldner 1998 ; Peng *et al.*, 1998), qui sera complexé à l'enzyme cristalline (Specht *et al.*, 2001), sa cryophotolyse *in-crystallo* par le biais d'un laser, puis l'application d'un profil de température adéquat, afin de déclencher une expulsion des molécules de choline des sites actifs de toutes les protéines du cristal (Colletier *et al.*, 2006c).

Structure de la TcAChE en complexe avec un putatif médicament anti-Alzheimer de seconde génération et implications pour le « drug-design » :

La cause la plus fréquente de démence sénile est probablement, de nos jours, la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie chronique entraîne une perte progressive, mais soutenue, de toutes les fonctions cognitives (mémoire, jugement, orientation, compréhension, capacité d'apprendre, langage, etc), laquelle est liée à une efficacité décrie des processus de neurotransmission et à la dégénérescence des circuits neuronaux du cerveau (Poirier, 2002). Chez les individus atteints de la MA, on observe une perte progressive du réseau de neurones cholinergiques et, conséquemment, une diminution assez forte du taux d'ACh dans le cerveau ; cet effet sera particulièrement substantiel au niveau des néo-cortex pariétaux et temporaux, ainsi qu'au niveau de l'hippocampe (Davies *et al.*, 1976 ; Whitehouse *et al.*, 1982). De fait, la première génération de médicaments anti-Alzheimer cible l'AChE ; son inhibition est destinée à restaurer, ou à maintenir, un taux d'ACh utile dans les tissus neuronaux. À ce jour, trois inhibiteurs cholinestérasiques sont couramment utilisés dans le traitement de la MA : le « donézépil » (chlorohydrate de donézépil), la « galantamine » (bromohydrate de galantamine) et la « rivastigmine » (tartrate de rivastigmine). Ces molécules ont un effet bénéfique à la fois sur la fonction cholinergique globale, et sur les fonctions cognitives.

Au-delà de son implication dans la neurotransmission cholinergique, l'AChE joue également un rôle « structural » dans le développement de la MA. Cette maladie se caractérise, étiologiquement, par la présence de « plaques amyloïdes » et d'enchevêtrements de neurofibrilles. Ces nouvelles structures tissulaires, pathologiques, sont la conséquence de la dénervation cholinergique (Braak & Braak, 1996 ; Farlow, 2002), et on trouve, associées à celles-ci, une isoforme de l'AChE produite par les cellules gliales (Arendt *et al.*, 1992 ; Moran *et al.*, 1993). Par un mécanisme impliquant son site périphérique (Inestrosa *et al.*, 1996), l'AChE promeut l'agrégation des fibres amyloïdes en plaques toxiques. De fait, la recherche sur d'éventuels nouveaux traitements contre la MA se focalise désormais sur la

production d'inhibiteurs bi-fonctionnels, pouvant se lier à la fois au site actif et au site périphérique de l'AChE. On pourrait ainsi résoudre le déficit cholinergique, tout en évitant la formation des plaques amyloïdes.

Le NF595 a été synthétisé en vue de bloquer l'accès aux sites actifs et périphériques de l'AChE (Savini *et al.*, 2003). Ce putatif médicament anti-Alzheimer de seconde génération comprend un noyau tacrine et un noyau thioacridine, liés par une chaîne aliphatique de 8 carbones. La structure du complexe de cet inhibiteur avec la *TcAChE* (Figure 2a) a révélé une réorganisation majeure du site périphérique de l'enzyme (Figure 2b - Colletier *et al.*, 2006a).

Cette observation est particulièrement intéressante car elle permet d'espérer un ralentissement de la formation des plaques amyloïdes dans les cerveaux de patients atteints de la MA. En effet, mieux que de simplement masquer le site périphérique, le NF595 induit le déplacement de ses deux constituants principaux, à savoir le Trp279 et la Tyr70 (numérotation pour la *TcAChE* dans tout le document, sauf indication contraire). Une telle réorganisation du site périphérique pourrait bloquer l'agrégation des fibres amyloïdes en plaques. Cette structure apporte donc une information de poids en vue du développement de drogues plus efficaces contre la MA. Il faut noter qu'un changement conformationnel d'une ampleur similaire a été observé dans le complexe de la *mAChE* avec un autre inhibiteur bifonctionnel, le *synI-TZ2/PA6* (Bourne *et al.*, 2004) ; ceci suggère une plasticité importante du site périphérique des AChEs, en général.

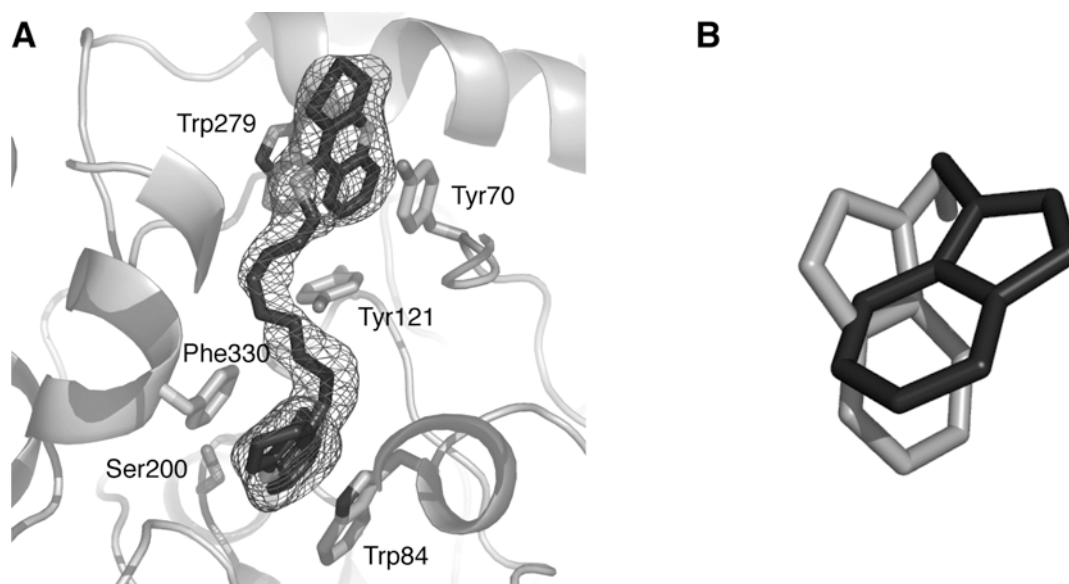


Figure 2 : Fixation d'un double inhibiteur, le NF595, dans la gorge de la TcAChE (A). Le NF595, les résidus de la protéine participant à sa stabilisation dans le site actif (Trp84, Phe330) et au niveau du site périphérique (Trp279, Tyr70 et Tyr121), et la serine catalytique (Ser200) sont montrés en bâtonnets. La carte de densité électronique Fo-Fc, obtenue après omission des coordonnées de l'inhibiteur, est affichée à $+4.5\sigma$. La figure est reproduite de Colletier *et al.*, 2006a. Plasticité conformationnelle du principal constituant du site périphérique de la TcAChE (Trp279) (B). Les conformations du Trp279 dans la TcAChE native (en noir – Sussman *et al.*, 1991) et dans le complexe TcAChE/NF595 (en gris clair – Colletier *et al.*, 2006a) sont superposées. *Binding of a bifunctional inhibitor, NF595, in the active site gorge of TcAChE (A). NF595, the residues involved in its stabilization in the active site (Trp84, Phe330) and at the peripheral site (Trp279, Tyr70 et Tyr121), and the catalytic serine (Ser200) are shown in sticks. The “omit”- Fo-Fc electron density map, computed after omitting the atomic coordinates of the inhibitor, is contoured at $+4.5\sigma$. The figure is reproduced from Colletier et al., 2006a. Conformational plasticity of the principal constituent in the peripheral-site of TcAChE, i.e. Trp279 (B). The conformations of Trp279 in native TcAChE (black – Sussman et al., 1991) and in the TcAChE/NF595 complex (light gray – Colletier et al., 2006a) are shown.*

Le changement conformationnel du site périphérique, observé pour la première fois sur la TcAChE, n'avait pas pu être prédit par les études de « flexible docking », et il relance donc la question du modèle le plus approprié en terme de « drug-design ». Le modèle « lock-and-key », quoique maintes fois vérifié, doit être considéré avec précaution puisque la complexation d'un inhibiteur peut sélectionner une conformation particulière de sa cible. Afin d'expliquer et de prédire les changements conformationnels pouvant être subis par une protéine suite à la

fixation d'un ligand, deux autres modèles ont été proposés. Le modèle « induced-fit » propose que la fixation d'un ligand induit une re-modélisation du paysage conformationnel de la molécule cible ; dans ce cas, la structure obtenue après fixation du ligand correspond à celle de plus basse énergie pour le complexe. Une autre hypothèse avance que le paysage conformationnel d'une protéine ne change pas sous l'effet de la liaison d'un inhibiteur, mais que ce dernier sélectionne, dans le paysage conformationnel natif de celle-ci, la conformation pré-existante qui convient le mieux à sa fixation ; on parle alors de « pre-existing equilibrium conformational selection » (Tobi & Bahar, 2005). En ce qui concerne le complexe *TcAChE/NF595*, il n'a pas été possible d'attribuer à l'une ou l'autre de ces hypothèses l'origine du changement conformationnel observé. En effet, seule une simulation de dynamique moléculaire pourrait confirmer, ou infirmer, que la conformation observée au niveau du site périphérique de l'enzyme existe dans son paysage conformationnel natif. Quoiqu'il en soit, la structure de ce complexe rappelle l'importance de la dynamique pour comprendre ou prédire le mode de fixation d'un ligand, et la limite évidente du modèle « lock-and-key ». En effet, en vue de la production d'un inhibiteur « sur-mesure » pour une enzyme donnée, il ne faudra pas considérer celle-ci comme un moule rigide, mais plutôt comme un objet dynamique qui peut s'adapter, structuralement, à l'inhibiteur.

Comportement cinétique de l'AChE :

Le turn-over (k_{cat}) de l'AChE est, selon l'espèce, compris entre 1000 et 20000 molécules de substrat hydrolysées par seconde, et son efficacité catalytique (k_{cat}/Km) d'environ $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; la diffusion de substrats et de produits, vers et à partir du site actif, constitue pratiquement l'étape limitante de la réaction d'hydrolyse (Rosenberry, 1975 ; Quinn, 1987). De fait, l'AChE peut être considérée comme « catalytiquement » parfaite. La limite théorique pour l'efficacité catalytique d'une enzyme est en effet estimée entre 10^8 et $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les déterminants moléculaires de cette perfection catalytique ont été élucidés grâce aux études approfondies de mutagenèse dirigée (Gibney *et al.*, 1990 ; Fournier *et al.*, 1992a ; Fournier *et al.*, 1992b ; Mutero *et al.*, 1992 ; Shafferman *et al.*, 1992a,b ; Duval *et al.*, 1992 ; Harel *et al.*, 1992 ; Vellom *et al.*, 1993 ; Ordentlich *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Shafferman *et al.*, 1994 ; Kronman *et al.*, 1994 ; Ordentlich *et al.*, 1995 ; Masson *et al.*, 1996 ; Radic *et al.*, 1997 ; Ordentlich *et al.*, 1998 ; Szegletes *et al.*, 1998 ; Morel *et al.*, 1999 ; Brochier *et al.*, 2001 ; Kaplan *et al.*, 2001 ; Barak *et al.*, 2002 ; Frémaux *et al.*, 2002 ; Clery-Barraud *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2004 ; Kaplan *et al.*, 2004), et au nombre considérable de structures cristallines déterminées pour des AChEs natives ou en complexe avec différents inhibiteurs (Sussman *et al.*, 1991 ; Harel *et al.*, 1992 ; Harel *et al.*, 1993 ; Harel *et al.*, 1995 ; Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1996 ; Raves *et al.*, 1997 ; Kryger *et al.*, 1998 ; Bartolucci *et al.*, 1999 ; Bourne *et al.*, 1999 ; Kryger *et al.*, 1999 ; Millard *et al.*, 1999a,b ; Harel *et al.*, 2000 ; Kryger *et al.*, 2000 ; Weik *et al.*, 2001b ; Felder *et al.*, 2002 ; Bourne *et al.*, 2003 ; Bourne *et al.*, 2004 ; Greenblatt *et al.*, 2004 ; Colletier *et al.*, 2006a,b). Ces études ont montré que l'AChE possède deux sites de fixation pour son substrat, le site catalytique et le site périphérique. La première étape de la catalyse enzymatique est la fixation du substrat sur le site périphérique (Szegletes *et al.*, 1998), à partir duquel il glissera ensuite vers le site actif où il sera rapidement hydrolysé.

Dans le site actif se trouve la machinerie catalytique de l'enzyme ; celle-ci comprend : i/ la triade catalytique (résidus Ser200, His440 et Glu327), responsable de l'hydrolyse de l'ACh, à proprement parler ; ii/ le sous-site anionique (résidus Trp84, Glu199 et Phe330), qui stabilise la portion choline (Ch) de la molécule d'ACh ; iii/ le trou oxyanion (résidus Gly118, Gly119 et Ala201), qui favorise la formation de l'intermédiaire tétraédrique en accueillant l'oxygène négativement chargé du carbonyle de l'ACh ; iv/ et la poche acyle (résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331), qui stabilise le méthyle de la portion acétate durant la catalyse.

Le mécanisme catalytique de l'AChE est celui, typique, d'une hydrolase à sérine : i/ après fixation du substrat dans le site actif, la sérine catalytique attaque le groupement carbonyle de l'ACh et forme l'intermédiaire tétraédrique ; ii/ ce dernier se décompose rapidement, libérant la choline et laissant l'enzyme acétylée ; iii/ une molécule d'eau permet ensuite la déacétylation, régénérant ainsi l'enzyme libre.

La particularité cinétique de l'AChE est le fait qu'elle est inhibée par son propre substrat, à hautes concentrations (Allès & Hawes, 1940) (Figure 3). Plusieurs modèles cinétiques ont été proposés, depuis les années 60, afin d'expliquer l'origine de ce phénomène : une controverse subsiste néanmoins quant au degré d'implication du site périphérique. Il avait été postulé, très précocement (Krupka & Laidler, 1961), que l'inhibition de l'AChE par son substrat soit due à un ralentissement de l'étape de désacétylation, induit par la fixation d'une molécule de substrat dans le site actif de l'enzyme acétylée. Un autre modèle cinétique, plus intuitif, a par la suite été proposé par le groupe de T. Rosenberry (Szegletes *et al.*, 1998). Suivant ce modèle, ce serait le blocage de la sortie du produit choline (Ch) par une molécule de substrat liée au site périphérique, qui endosserait la responsabilité de l'inhibition de l'AChE par son substrat. Un nouveau modèle a récemment été proposé, par le groupe de D. Fournier, qui a réconcilié ces deux conceptions différentes de l'inhibition par le substrat (Stojan *et al.*, 2004). D'après ce dernier, l'inhibition par le substrat serait un phénomène à deux étapes : à moyennement hautes concentrations en substrat, l'inhibition de la sortie du produit Ch, par une molécule de substrat liée au site périphérique de l'enzyme, serait responsable d'un ralentissement de la catalyse. L'inhibition « totale », quant à elle, ne serait atteinte qu'à des concentrations bien plus élevées de substrat et résulterait de la fixation de deux molécules de substrats à l'enzyme acétylée, au niveau du site périphérique et dans le site actif, respectivement. La validité de ce modèle a été démontrée structuralement (Colletier *et al.*, 2006b).

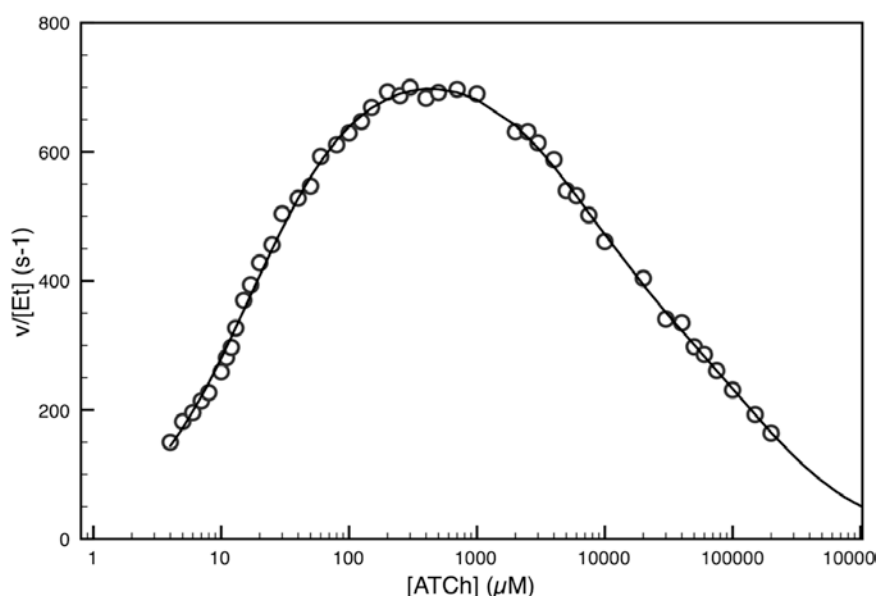


Figure 3: Hydrolyse de l'ATCh par la TcAChE (Colletier *et al.*, 2006b). La vitesse d'hydrolyse à pH 7.0 et dans un tampon 25mM sodium phosphate est exprimée en fonction de la concentration en ATCh (cercles). Les données furent ajustées (ligne pleine ; coefficient de corrélation global : 0.9984) en utilisant l'équation du modèle Stojan *et al.*, 2004, qui suppose deux mécanismes d'inhibition par le substrat. *pS curve for ATCh hydrolysis by TcAChE (Colletier et al., 2006b). The rate of hydrolysis at pH 7.0 and in 25 mM sodium-phosphate buffer is shown as a function of ATCh concentration (circles). The data were fitted (line; global correlation coefficient of 0.9984) by using the equation of the Stojan et al., 2004 model, involving two different substrate inhibition phenomena.*

Caractérisation structurale d'états intermédiaires de réaction et pertinence pour le trafic des substrats et produits au sein de l'AChE :

Afin d'obtenir une information structurale sur le trafic des substrats et produits au sein de l'AChE, nous avons pris avantage de la possibilité de ralentir la catalyse dans le cristal grâce au phénomène d'inhibition par le substrat (Colletier *et al.*, 2006b). Dans cette étude, l'acétylthiocholine (ATCh), qui est hydrolysée aussi efficacement que le substrat naturel par l'AChE (Ellman *et al.*, 1961), a été préférée à l'ACh. Ce choix se justifie principalement par la substitution par un soufre de l'oxygène liant la portion acétate et la portion choline dans l'ACh. Cet atome, dont le pouvoir diffusant aux rayons X est deux fois celui de l'oxygène, a

facilité la localisation et l'orientation des molécules de substrat dans les cartes de densité électronique. De plus, la méthode spectrophotométrique courante pour mesurer de l'activité de l'AChE est basée sur l'utilisation de ce substrat modifié, mais catalytiquement équivalent à l'ACh (Ellman *et al.*, 1961). Des mesures d'activité enzymatique ont donc été réalisées en préalable à l'expérience cristallographique (Colletier *et al.*, 2006b) (Figure 3) afin d'estimer les concentrations idéales pour le trempage des cristaux. Ainsi ont été caractérisées les structures de deux complexes enzyme–substrat–produit(s) différents, à des concentrations différentes de substrat (Colletier *et al.*, 2006b), qui ont prouvé, structuralement, que le phénomène d'inhibition par le substrat était un mécanisme à deux étapes. À moyennement haute concentration, le substrat lié au site périphérique de l'enzyme bloque la sortie des deux produits d'hydrolyse, *i.e.* la choline et le groupement acétylé lié à la Ser200 (Figure 4a). Cette inhibition n'est que partielle et, sitôt la choline sortie, la désacétylation de l'enzyme survient avant qu'une autre molécule de substrat ne pénètre dans le site actif. A haute concentration de substrat cependant, la désacétylation de l'enzyme est moins rapide que la diffusion du substrat du site périphérique au site actif (Figure 4b); en conséquence, l'enzyme ne se désacétyle plus, et la catalyse est complètement bloquée. Ces deux structures ont permis de réconcilier la thèse de l'inhibition de la désacétylation (Krupka & Laidler, 1961) et le modèle du blocage stérique de la sortie des produits (Szegletes *et al.*, 1998). Elles ont par ailleurs confirmé la validité d'un modèle cinétique qui prévoyait la nécessité de ces deux étapes (Stojan *et al.*, 2004) pour rendre compte intégralement des données cinétiques sur l'AChE.

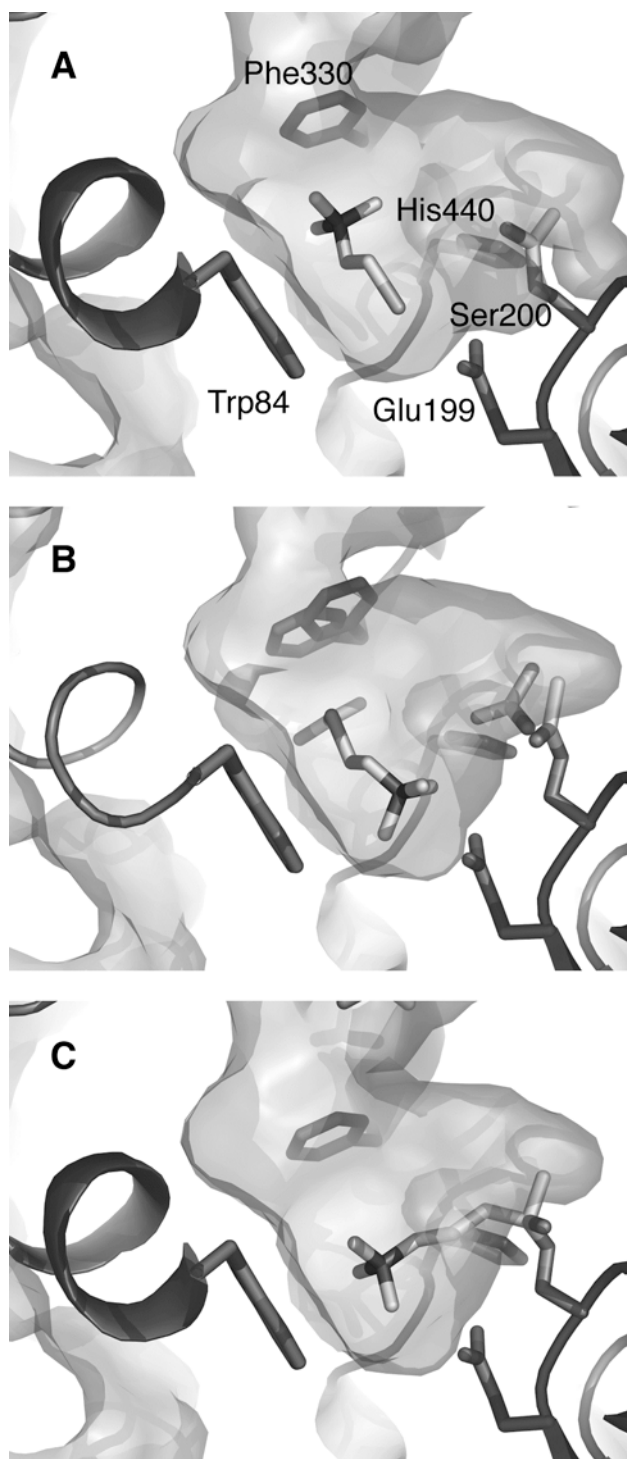


Figure 4: (A) Structure de la TcAChE après trempage des cristaux dans 20 mM d'ATCh; les deux produits d'hydrolyse, *i.e.* la thiocholine et le groupement acétyle lié à la Ser200, sont bloqués dans le site actif par une molécule de substrat liée au site périphérique (non montrée). (B) Structure de la TcAChE après trempage des cristaux dans 500 mM d'ATCh; une molécule de substrat se lie dans le site actif de l'enzyme acétylée, empêchant de fait la désacétylation de Ser200. Un acétate libre (taux d'occupation 50%) et en équilibre avec le groupement acétyle (taux d'occupation 50%) lié à la Ser200. Une autre molécule de substrat est liée au site périphérique (non montrée). (C) Structure de la TcAChE à 0,5 mM d'OTMA; l'analogue de substrat mime l'intermédiaire tétraédrique dans le site actif de l'enzyme. Une autre molécule d'OTMA est liée au site périphérique (non montrée). (A) *Structure of TcAChE after soaking the crystal in 20 mM ATCh; the two hydrolysis products, thiocholine and the acetyl group linked to Ser200, are blocked in the active site by a substrate molecule bound at the peripheral (not shown).* (B) *Structure of TcAChE after soaking the crystal in 500 mM ATCh; a substrate molecule binds in the active site of the acetylated enzyme, hence forbidding deacetylation to occur. A free acetate (occupancy 50%) is in equilibrium with the acetyl group on Ser200 (occupancy 50%). Another substrate molecule is bound at the peripheral (not shown).* (C) *Structure of TcAChE at 0.5 mM OTMA; the substrate analogue mimics the tetrahedral intermediate in the active site on the enzyme. Another OTMA molecule is bound at the peripheral site (not shown).*

La structure de l'AChE en complexe avec l'OTMA (4-oxo-*N,N,N*-triméthylpentanaminium), un analogue de substrat non-hydrolysable, a également été résolue, autorisant la

caractérisation de l'état pré-productif de l'enzyme (Colletier *et al.*, 2006b) (Figure 4c). Cet analogue est structuralement très proche de l'ACh et de l'ATCh : seul l'oxygène, liant la portion acétate et la portion choline dans l'ACh, a été remplacé par un carbone. Ainsi, la molécule d'OTMA mime, dans le site actif de l'enzyme, l'intermédiaire tétraédrique formé juste avant que la première étape de la catalyse ne survienne, *i.e.* la libération de la choline (Figures 4a et 4c). Cette structure a révélé que la liaison de deux molécules d'analogue de substrat, au site actif et au site périphérique de l'AChE, entraîne la fermeture de la gorge à mi-hauteur (mouvement de Phe330), séquestrant la molécule liée dans le site actif. La grande efficacité catalytique de l'AChE pourrait trouver son origine dans le piégeage du substrat qui, étant parvenu jusqu'au fond de la gorge, ne pourra plus en sortir que sous la forme de ses produits d'hydrolyse.

Les structures de la TcAChE en complexe avec l'OTMA, l'ATCh et la thiocholine (Colletier *et al.*, 2006b) ont permis de lever le voile sur le trafic des substrats au sein de l'AChE. Le substrat se lie dans un premier temps au site périphérique, avec sa portion choline pointant vers l'intérieur de la gorge ; cette orientation permet la glisse directe du substrat vers le site actif, sans nécessité de se réorienter à l'intérieur de la gorge. Une fois dans le site actif, le substrat y sera retenu jusqu'à ce qu'hydrolyse s'ensuive, principalement stabilisé par une interaction cation- π avec le Trp84 et par les interactions de l'oxygène de sa portion acétate avec les résidus du trou oxyanion (Figure 4c). La Phe330, un résidu trouvé à mi-hauteur de la gorge, subit une rotation de 90° en direction du site actif qui permet la mise en place d'une interaction cation- π supplémentaire avec la portion choline du substrat et, surtout, bloque l'accès au site actif. L'intermédiaire tétraédrique est alors formé, qui, très rapidement, se décompose en choline et enzyme acétylée. Pour que la choline puisse sortir, la Phe330 devra revenir à sa position initiale, ce qui réclamera probablement une dépense énergétique

supplémentaire. Une fois la choline expulsée, la désacétylation de l'enzyme surviendra, qui régénèrera l'enzyme libre.

Sur la base d'une simulation de dynamique moléculaire (Gilson *et al.*, 1996), il a été proposé que le produit choline puisse quitter le site actif de l'enzyme par un chemin de sortie alternatif (ou « back-door »), laissant ainsi la gorge libre pour l'entrée des substrats. Cette « back-door », invisible dans la structure statique, s'ouvrirait juste derrière le sous-site anionique du site actif où est stabilisée la choline, *i.e.* au niveau du Trp84. Plusieurs autres simulations de dynamique moléculaire ont conforté cette hypothèse (Axelsen *et al.*, 1994 ; Tai *et al.*, 2001 ; Tai *et al.*, 2002 ; Bui *et al.*, 2004), mais aucune preuve expérimentale directe, la confirmant ou l'infirant, n'a été apportée. De nombreuses campagnes de mutagenèse dirigée ont tenté d'établir son existence, mais aucune n'a démontré la nécessité d'une « back-door » pour expliquer la catalyse enzymatique (Kronman *et al.*, 1994 ; Velan *et al.*, 1996 ; Faerman *et al.*, 1996). Plusieurs rapports, pourtant, font état d'une activité résiduelle de l'AChE en présence de fasciculine (Marchot *et al.*, 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1995), un inhibiteur qui cible le site périphérique de l'AChE et bloque totalement l'entrée du site actif [Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Kryger *et al.*, 2000]. Cette observation est une indication forte concernant l'existence d'entrées et/ou de sorties alternatives pour le substrat et/ou les produits, mais qui reste à confirmer expérimentalement.

Suivre l'expulsion de la choline par la TcAChE grâce à la cristallographie cinétique:

En vue d'élucider par quel chemin la choline est expulsée du site actif de l'AChE, nous avons développé une stratégie nouvelle en cristallographie cinétique des protéines. Celle-ci combine l'utilisation d'un précurseur photosensible de ce produit (*i.e.* une choline 'en cage' – Peng *et al.*, 1996 ; Peng & Goeldner, 1998; Peng *et al.*, 1998), sa photolyse *in-crystallo* par le biais

d'un laser (Specht *et al.*, 2001) et l'application de profils de température adéquats (Ursby *et al.*, 2002) afin de piéger différents états intermédiaires de réaction (Figure 5).

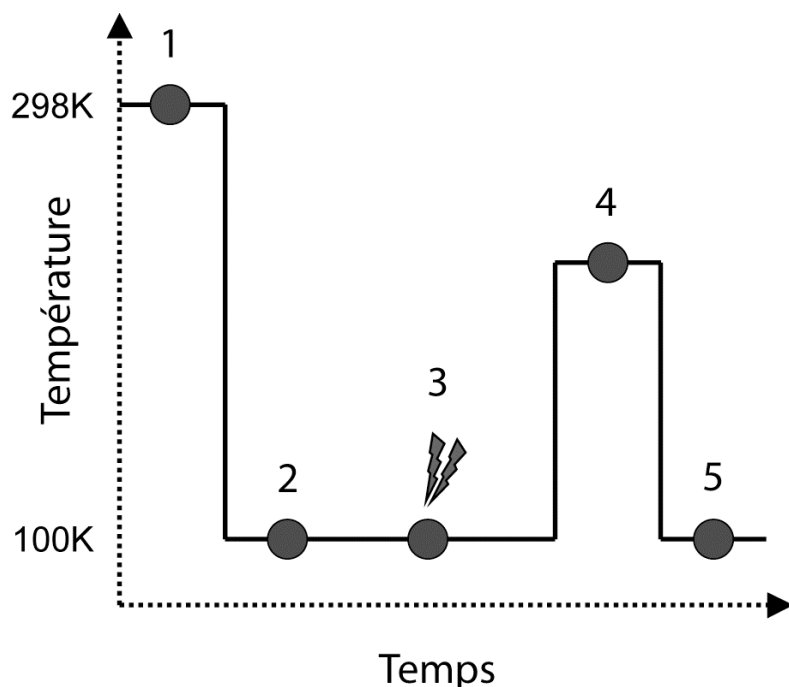


Figure 5 : Une nouvelle approche en cristallographie cinétique. La choline 'en cage' (*i.e.* le précurseur photolabile de la choline) est complexée à l'enzyme cristalline à température ambiante (1), puis le cristal est refroidi de façon ultrarapide grâce à un flux d'azote gazeux à 100K (2). La photodissociation de la choline 'en cage' est induite par l'exposition à un laser UV (3). Le système est alors soumis à une hausse transitoire de la température (4). Ainsi on pourra obtenir différents instantanés de l'AChE en cours d'expulsion de son produit, la choline, qui seront caractérisés à 100 K par cristallographie aux rayons X (5). *A new approach in kinetic crystallography. The caged choline (i.e. a photolabile precursor of choline) binds to the crystalline enzyme at room temperature (1), and the crystal is then flash-cooled to 100 K in a gaseous nitrogen stream (2). The photodissociation of the caged choline into a free cage and choline is induced by exposing the crystal to the beam of a UV laser (3). The crystal is then subjected to a transient temperature increase (4). Snapshots of AChE in the action of expelling one of its product, choline, are then expected to be obtained, which can be characterised by X-ray crystallography at 100 K (5).*

Dans cette approche, la choline 'en cage' est complexée à l'enzyme cristalline au niveau de son site actif. Le cristal est alors refroidi à 100 K de façon ultrarapide, puis exposé au faisceau d'un laser UV qui assure la photodissociation de la choline et de sa cage. La choline libérée se

trouve alors prête à quitter le site actif. À 100 K, nous supposons que l'enzyme et le solvant seront trop rigides pour que la sortie de la choline puisse avoir lieu. Une hausse de température transitoire pourrait autoriser la survenue de cet événement, permettant à la fois à l'enzyme, à la choline et au solvant de se mouvoir. Le piégeage et la caractérisation d'un état intermédiaire seraient ensuite assurés par le retour rapide du cristal à 100 K et la collecte de données cristallographiques. Cette nouvelle approche en cristallographie cinétique devrait nous permettre de structuralement suivre la sortie de la choline du site actif de l'ACHé, et de possiblement confirmer, ou infirmer, l'existence d'une « back-door » au sein de cette famille d'enzymes (Colletier *et al.*, 2006c).

Remerciements :

Nous remercions chaleureusement nos collaborateurs de longue date Dominique Bourgeois, Didier Fournier, Maurice Goeldner, Harry M. Greenblatt, Patrick Masson, Florian Nachon, Antoine Royant, Benoît Sanson, Israël Silman, Alexandre Specht, Jure Stojan, Joël. L. Sussman et Joseph Zaccai. Nous remercions également Raimond G.B. Ravelli, John McGeehan et Johanne McCarthy pour leur aide dans les montages expérimentaux et la collecte de données cristallographiques à l'ESRF de Grenoble. Nous sommes reconnaissants au CEA, au CNRS et à l'UJF pour leur soutien financier sur les trois projets décrits dans ce document.

Chapitre VII :

Discussion, conclusion et perspectives

VII – Discussion générale, conclusions et perspectives :

L'objectif de cette thèse était de fournir un aperçu structural du paysage conformationnel de l'AChE, une enzyme d'intérêt fondamental des points de vue clinique et toxicologique. Différentes approches de la cristallographie aux rayons X ont été développés et exploitées, qui ont permis d'obtenir des informations inédites sur la structure et la dynamique de cet objet macromoléculaire.

Dans un premier temps, la structure du complexe de la TcAChE avec un putatif médicament anti-Alzheimer de seconde génération, le NF595 (Savini *et al.*, 2003), a été résolue. Cette structure a permis de lever le voile sur la dynamique jusqu'alors insoupçonnée du site périphérique de la TcAChE (Colletier *et al.*, 2006a,d). Elle apporte *en sus* une information de poids dans le contexte du développement de médicaments plus adaptés et plus puissants contre la maladie d'Alzheimer. Ce site est en effet impliqué dans la promotion de la formation des plaques amyloïdes, au cours du développement de la maladie (Inestrosa *et al.*, 1996) : l'induction de sa déstructuration pourrait donc avoir un effet clinique bénéfique. La mise en évidence de la plasticité de ce site (Bourne *et al.*, 2004 ; Colletier *et al.*, 2006a) souligne l'importance de la dynamique d'une protéine en vue de mieux comprendre son mécanisme de fonctionnement, rappelant qu'une enzyme est un objet biomoléculaire complexe, qui acquiert ou perd sa fonction aux travers des mouvements autorisés à sa structure.

Le trafic des substrats et produits au sein de l'AChE a également été étudié. A dessein, deux approches méthodologiques ont été développées, applicables, en théorie, à un spectre plus large d'enzymes : une approche « steady-state », *i.e.* basée sur la mise en équilibre du système enzyme/substrat à différentes concentrations dudit substrat, et une approche « cinétique », où

le piégeage d'états intermédiaires de réaction est permis grâce à l'utilisation combinée de composés-en-cage et de profils de température adéquats.

Notre approche « steady-state » a pris avantage du phénomène d'inhibition par le substrat, *i.e.* du fait que l'AChE est inhibée par les hautes concentrations de son propre substrat. Nous avons ainsi pu obtenir les structures de deux complexes différents de l'enzyme avec son substrat et soit un, soit deux de ses produits. Pour ce faire, une étude cinétique préalable sur la TcAChE a été nécessaire, qui a permis d'estimer les concentrations idéales auxquelles devaient se faire les trempages des cristaux. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'à 20 et 500 mM de substrat, respectivement, deux espèces différentes prédomineraient dans le cristal, lesquelles ont par la suite été accumulées par trempage des cristaux dans des solutions de liqueur mère contenant soit 20, soit 500 mM d'ATCh, puis caractérisées structuralement. La structure de l'état pré-productif de l'enzyme, *i.e.* celui formé juste avant que la première étape de la catalyse ne survienne, a également été résolue grâce à l'utilisation d'un analogue de substrat non-hydrolysable. Prises conjointement, ces structures ont permis une description détaillée du trafic des substrats et produits au sein de l'enzyme. Elles ont, par ailleurs, révélé les bases structurales du phénomène d'inhibition par le substrat (Colletier *et al.*, 2006b,d), confirmant la validité d'un modèle cinétique prévoyant que deux espèces inhibées puissent être formées à plus ou moins hautes concentrations de substrat (Stojan *et al.*, 2004).

L'observation répétée d'une activité résiduelle pour le complexe de l'AChE avec le peptide fasciculine (Marchot *et al.* 1993 ; Radic *et al.*, 1994 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1995 – voir section 2), un inhibiteur de type « slow-binding » qui bloque complètement l'entrée de la gorge ($\approx 2000 \text{ \AA}^2$ de surface de contact – Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Botti *et al.*, 1999 ; Kryger *et al.*, 2000), suggère qu'un ou des chemins d'accès alternatifs au site actif se mettent en place lorsque l'accès *via* la gorge n'est plus possible. Cette hypothèse pourrait

être vérifiée structuralement en reprenant notre approche « steady-state » sur un co-cristal du complexe de l'AChE avec la fasculine. Il s'agit là d'une des perspectives à court terme de cette thèse, pour laquelle un financement a d'ailleurs été demandé à l'Organisation Européenne de Biologie Moléculaire (EMBO).

Cette approche de cristallographie cinétique en « steady-state » pourra, par ailleurs, être appliquée à d'autres enzymes qui, comme l'AChE, sont inhibées par leur propre substrat. Ce phénomène cinétique semble être une propriété générale des enzymes à site actif enfoui (Stojan *et al.*, 2004), bien que sa mise en évidence soit souvent limitée par la solubilité du substrat. C'est le cas bien connu de la butyrylcholinestérase (BChE), une « cousine » structuralement très proche de l'AChE, dont l'inhibition par le substrat a longtemps été ignorée du fait de la faible solubilité de son substrat de référence, la butyrylcholine (BCh). L'inhibition par le substrat sera d'autant plus prononcée que l'accès au site actif sera restreint ; ainsi est-elle relativement plus faible dans le cas de la BChE, qui présente une gorge relativement plus large, que dans le cas de l'AChE. Plusieurs enzymes sont d'ors et déjà candidates à l'application de notre méthode « steady-state » ; la BChE, bien entendu, mais aussi l'alcool déshydrogénase (Daziel & Dickinson, 1966 ; Dickinson & Daziel, 1967 ; Winberg & McKinley-McKee, 1994) et la lactate déshydrogénase (LDH – Gutfreund *et al.*, 1968 ; Coulson & Rabin, 1969 ; White *et al.*, 1973 ; Eszes *et al.*, 1996 ; Hewitt *et al.*, 1999). Dans le cas de l'alcool déshydrogénase, plusieurs structures ont déjà été publiées (Benach *et al.* 1998 ; Benach *et al.*, 2000 ; Benach *et al.*, 2005), dont une du complexe avec le produit enzymatique NAD-kétone (NAD : nicotinamide-adénine dinucléotide) (Benach *et al.*, 1999) ; la mise en œuvre de notre méthode pour étudier le trafic du substrat au sein de cette enzyme devrait donc être relativement aisée. En ce qui concerne la LDH, plusieurs structures sont également disponibles (Stoll *et al.*, 1996 ; Auerbach, 1998 ; Dym *et al.*, 2000) dont celles de *Plasmodium falciparum* (Dunn *et al.*, 1996) et *Plasmodium vivax* (Chaikuad *et al.*, 2005), les

agents parasitaires responsables de la transmission de la Malaria (ou paludisme ; cette maladie tue, dans le monde, 1 enfant toutes les 30 secondes, et entre 1 et 3 millions de personnes par an). La comparaison des différentes structures de LDH a révélé des différences structurales uniques dans le genre *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax* & *P. Breghei* – Winter *et al.*, 2003). Cette enzyme est donc une candidate privilégiée en vue du développement d'inhibiteurs spécifiques pour le traitement de la Malaria (Dunn *et al.*, 1996 ; Read *et al.*, 1999 ; Winter *et al.*, 2003 ; Brady & Cameron, 2004 ; Cameron *et al.*, 2004 ; Chaikuad *et al.*, 2005). Le Laboratoire de Biophysique Moléculaire (Institut de Biologie Structurale), au sein duquel a été réalisée cette thèse, possède une expertise unique sur cette famille d'enzymes (Madern *et al.*, 2000a,b ; Madern *et al.*, 2001 ; Madern *et al.*, 2002 ; Madern *et al.*, 2004 ; Tehei *et al.*, 2005). Il serait donc envisageable, à plus ou moins court terme, de mener une étude similaire à celle déjà réalisée sur l'AChE, idéalement sur une LDH du genre *Plasmodium*.

Il faudra, dans tous les cas, faire précéder l'étude cristallographique par une caractérisation des propriétés cinétiques de l'enzyme. Ce préalable permet en effet de déterminer les concentrations en substrat auxquelles se placer en vue d'accumuler telle ou telle espèce prédominante, et réduit donc le caractère aléatoire, aux implications parfois épuisantes, d'une expérience de cristallographie cinétique. Il faudra également respecter, lors du trempage des cristaux, les règles de base de l'enzymologie « steady-state », *i.e.* maintenir une concentration constante de substrat jusqu'à l'équilibration complète du système. Ainsi avons-nous dû, dans notre étude sur l'AChE, changer plusieurs fois les solutions de trempage, tout en fournissant des volumes considérables (200 à 1500 µl de solution de trempage pour un cristal de 3 à 6 nl de volume).

La contribution majeure de cette thèse reste cependant le développement d'une méthodologie nouvelle en cristallographie « cinétique », basée sur l'utilisation de composés-en-cage et l'application de profils de température adéquats en vue de piéger des états intermédiaires de réaction enzymatique (Colletier *et al.*, 2006c,d). Bien que toutes les expériences et résultats n'aient pas été présentés ici, par souci de clarté et de concision, la participation à cet effort de développement méthodologique aura constitué la plus grande partie des travaux de cette thèse. Plus d'une deux centaine de jeux de données cristallographiques ont été collectés pour développer cette approche ; trois types de composés-en-cage ont été testés sur l'AChE, cristallisée dans deux groupes d'espace, mais aussi sur la BChE ; radiolyse et photolyse des composés cagés ont été explorées, dans ce dernier cas, à 266 et 355 nm ; enfin la flexibilité de la protéine a été sondée dans la gamme de température 100-190 K, et les gammes de temps accessibles aux divers types de cristaux lors d'un recuit transitoire à température ambiante (*i.e.* la procédure 100 K \rightarrow 298 K pour x secondes \rightarrow 100 K – Voir pages 81 et 142) ont été caractérisées. Ces expériences ont, dans leur globalité, permis de démontrer la validité et l'applicabilité de cette méthode, mais aussi d'en identifier les limites.

Dans le cas particulier de notre étude sur l'AChE, nous visions à suivre l'expulsion d'un des deux produits de la réaction enzymatique, *i.e.* la choline. De fait, une choline-en-cage a été synthétisée (Peng *et al.*, 1996 ; Peng & Goeldner, 1998 ; Peng *et al.*, 1998), dont la cage nitro-phenyl-(trifluoro)-ethyl est dissociable de la choline par l'application d'un flash UV (Specht *et al.*, 2001). Nous avons pu vérifier que la photolyse est déclenchable *in-crystallo* par l'utilisation d'un laser UV à 266 ou 355 nm. A températures cryogéniques (100-190 K) cependant, et malgré l'obtention d'une signature spectrale, il semble que la photolyse ne soit pas suffisamment efficace et ne permette donc pas l'accumulation d'un état intermédiaire de réaction (Bourgeois & Weik, 2005). De même, une signature spectrale est obtenue sous l'effet de la radiolyse, mais qui ne se traduit structuralement qu'à des doses extrêmement fortes de

rayons X. Étant données ces limitations, un compromis a consisté en l'irradiation des cristaux par un laser UV (266 nm) lors d'un retour rapide à température ambiante. La photolyse a ainsi pu être maximisée, et la survenue des mouvements nécessaires à l'expulsion des produits de photolyse, autorisée. La trempe rapide du cristal à 100 K, quelques secondes après l'initiation de la réaction à température ambiante, a permis la caractérisation d'une structure de la TcAChE au cours de l'expulsion des produits de photolyse. Cette expulsion est concomitante avec le développement de désordres locaux au sein des sites actif et périphérique de l'enzyme ; elle s'accompagne, par ailleurs, d'une augmentation de 25% du volume de la gorge menant au site actif. Cette augmentation de volume traduit probablement la respiration moléculaire de l'enzyme, suggérée comme nécessaire pour le trafic des substrats et produits. Cela étant, aucun site de fixation intermédiaire pour la choline n'a été caractérisé, de même qu'aucun indice structural, qui aurait plaidé en faveur de l'existence d'une porte annexe de sortie (ou « backdoor ») pour ce produit, n'a pu être obtenu. Ces résultats suggèrent que la sortie du produit choline a lieu principalement, sinon uniquement, par la gorge de l'enzyme, et que l'ouverture d'une porte annexe n'est pas nécessaire à la survenue de cette sortie.

La plupart des expériences réussies en cristallographie cinétique ont jusqu'ici été réalisées sur des protéines intrinsèquement photosensibles (Bourgeois et Royant, 2005). Pour déclencher, de façon synchrone et efficace, une photo-réaction au sein d'un cristal, un laser est le plus souvent utilisé ; l'état intermédiaire formé est ensuite cryo-piégé, grâce au refroidissement ultrarapide du cristal dans l'azote liquide, ou gazeux.

L'utilisation de composés-en-cage, *i.e.* de précurseurs photodissociables de substrats et/ou de produits enzymatiques, vise à rendre artificiellement une enzyme photosensible, en vue d'appliquer ensuite les protocoles déjà éprouvés sur les protéines à photosensibilité endogène. L'intérêt majeur de cet artifice réside dans le fait que plusieurs types de cages peuvent être

considérées en vue de leur adjonction à plusieurs types de substrats et/ou de produits ; il y aurait donc une multitude de possibilités pour chaque enzyme.

Selon les propriétés du composé-en-cage, la photolyse pourra être déclenchée à température cryogénique (Ursby *et al.*, 2002) ou lors d'un retour rapide à température ambiante (Colletier *et al.*, 2006c). Dans le premier cas, un profil de température adapté devra être appliqué, ensuite de la photolyse, afin de permettre la survenue des mouvements de la protéine, du solvant et des produits de photolyse, nécessaires à l'accumulation d'un état intermédiaire (Weik *et al.*, 2001b). Alternativement, les rayons X peuvent également être utilisés pour déclencher des réactions à l'intérieur des cristaux (Schlichting *et al.*, 2000 ; Berglund *et al.*, 2002 ; Adam *et al.*, 2004 ; Baxter *et al.*, 2004 ; Colletier, Nachon, Masson & Weik, résultats non publiés). Nous avons pu vérifier qu'un retour transitoire à température ambiante ne s'accompagne pas forcément d'une perte de résolution du cristal (testé sur trois formes cristallines de la TcAChE et une forme cristalline de la BChE humaine), et ce parfois même après collecte d'un jeu de données (testé sur deux formes cristallines de la TcAChE). Il faudra, dans tous les cas, étudier préalablement les dommages d'irradiation dus soit aux rayons X, soit aux UV, afin de ne pas se fourvoyer lors de l'exploitation des données (Weik *et al.*, 2000 ; Weik *et al.*, 2002 ; Garman & Nave, 2002 ; O'Neill *et al.*, 2002 ; Garman, 2003 ; Nave & Garman, 2005 ; Murray *et al.*, 2005 ; Garman & Owen, 2006 ; Nanao *et al.*, 2005 ; Ravelli *et al.*, 2005 ; Colletier *et al.*, 2006c ; Nanao & Ravelli, 2006 ; Vernede *et al.*, 2006).

Nous espérons, dans tous les cas, que cette méthode sera appliquée à d'autres protéines. Comme pour l'AChE, la compréhension globale du mode d'action d'une enzyme ne peut être que facilitée par la mise en lumière, à « échelle atomique », des bases dynamiques de son fonctionnement biologique. Idéalement, il serait souhaitable de travailler sur des cristaux diffractant, nativement, à plus haute résolution que ceux de l'AChE ou de la BChE. Il s'avère

en effet que notre procédure se traduise, le plus souvent, par une perte de résolution des données cristallographiques ; partir de « plus haut » devrait permettre de tomber « moins bas ». De même, et quoique l'investissement premier ait déjà été immense, un effort supplémentaire devra être demandé aux chimistes. Il faudrait, dans un premier temps, se concentrer sur la synthèse de cages absorbant dans le visible plutôt que dans l'UV ; on maximiserait ainsi l'efficacité de la photolyse tout en évitant un endommagement concomitant de la protéine. On pourrait aussi, à terme, imaginer de synthétiser uniquement des cages pouvant être adaptées à volonté par « click chemistry » (Kolb *et al.*, 2001 ; Lewis *et al.*, 2002 ; Manetsch *et al.*, 2004 ; Bourne *et al.*, 2005 ; Krasinski *et al.*, 2005). La méthode décrite ici se réclamerait alors quasi universelle en cristallographie d'états intermédiaires, puisque applicable, en principe, à n'importe quelle protéine cristallisée pour laquelle existe un substrat ou produit en cage.

Il y a quelques années, l'Institut National de Recherche et de Sécurité affichait, dans les salles de TP universitaires, que la chimie était « la clef de la matière, et la fée de la vie ». Rajoutez un synchrotron, un cristal et un laser ; et plongez dans la magie de la cinématique biologique.

Chapitre IX:

Annexes

IX – Annexes :

IX-1 – Stojan et al., 2004.

IX-2 – Colletier et al., 2006a

XI-3 – Colletier et al., 2006b

Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate

Jure Stojan¹, Laure Brochier², Carole Alies², Jacques Philippe Colletier² and Didier Fournier²

¹Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia; ²IPBS-UMR 5089, Toulouse, France

Acetylcholine hydrolysis by acetylcholinesterase is inhibited at high substrate concentrations. To determine the residues involved in this phenomenon, we have mutated most of the residues lining the active-site gorge but mutating these did not completely eliminate hydrolysis. Thus, we analyzed the effect of a nonhydrolysable substrate analogue on substrate hydrolysis and on reactivation of an analogue of the acetylzyme. Analyses of various models led us to propose the following sequence of events: the substrate initially binds at the rim of the active-site gorge and then slides down to the bottom of the gorge where it is hydrolyzed. Another substrate

molecule can bind to the peripheral site: (a) when the choline is still inside the gorge – it will thereby hinder its exit; (b) after choline has dissociated but before deacetylation occurs – binding at the peripheral site increases deacetylation rate but (c) if a substrate molecule bound to the peripheral site slides down to the bottom of the active-site before the catalytic serine is deacetylated, its new position will prevent the approach of water, thus blocking deacetylation.

Keywords: acetylcholinesterase; deacetylation; inhibition; kinetics; structure-function.

Cholinesterases [acetylcholinesterases, (AChEs) and butyrylcholinesterases] are serine hydrolases that hydrolyze choline esters in two steps: acylation of the enzyme, followed by deacylation involving a water molecule [1]. In the case of AChEs, the process takes place at the acetylation site, located at the bottom of a 20 Å-deep gorge, usually called the active-site gorge. The site includes a tryptophan residue that interacts with the trimethylammonium group of acetylcholine, and a serine residue which is acetylated and hydrolyzed in the course of substrate turnover [2,3].

Kinetic studies of *Drosophila* AChE (*DmAChE*) have revealed an atypical behavior, with both apparent activation at low substrate concentrations and inhibition at high substrate concentrations [4]. It was established that kinetics result from only one enzymatic form, regulated by the substrate itself [5]. The substrate activation site was located using a competitive inhibitor of activation, Triton X-100, and mutated enzymes. It appeared that the activation site is located at the rim of the active-site gorge [6]. Binding of a substrate molecule at the activation site increases the deacetylation [7] and thereby cleans up the active-site gorge before sliding to its entrance. Additionally, binding of a substrate molecule at the rim of the gorge may participate in correctly orienting positively charged substrates, with a view

to their sliding down to the bottom of the gorge in the most favorable conformation. It would thus contribute to catalytic efficiency by transiently binding the substrate molecules on their way to the acetylation site [8–10].

Two kinds of evidence suggested localization of the substrate inhibition site at the rim of the gorge. First, substrate at high concentration was found to compete with ligands specific for the peripheral site [11–13]. Second, some mutations located at the rim of the gorge are known to affect substrate inhibition [14,15]. However, mutations of some other residues constituting the peripheral site did not influence substrate inhibition [16–18], while mutation of some residues located at the bottom of the active-site did. This led us to revive an old hypothesis whereby substrate inhibition results from substrate binding to the acetylated enzyme [19,20]. Thus, in the present paper, we explored the inhibition phenomenon occurring in the *DmAChE*, for a fuller understanding of its mechanism and to locate the site of this regulation.

Experimental procedures

Enzyme sources

Truncated *Drosophila melanogaster* cDNA encoding soluble AChEs, wild-type and mutated, were expressed with the baculovirus system [21]. Secreted AChEs were purified and stabilized with 1 mg·mL⁻¹ BSA as reported previously [22]. The concentration of the enzymes was determined by active-site titration using 7-(methylethoxyphosphinyloxy)-1-methylquinolinium iodide, a high-affinity phosphorylating agent [23]. Residue numbering is given according to the sequence of the mature *DmAChE* [3,24]; the corresponding numbering in the *Torpedo* AChE sequence is shown in Table 1.

Correspondence to D. Fournier, IPBS-UMR 5089, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France.
Fax: +33 5 61 17 59 94, Tel.: +33 5 61 55 54 45,
E-mail: fournier@ipbs.fr

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; ATCh, acetylthiocholine; *DmAChE*, *Drosophila* AChE.

(Received 24 September 2003, revised 20 January 2004, accepted 23 February 2004)

Table 1. Substrate concentrations (mmol·L⁻¹) at which the optimum and the inflexion point at the inhibition part of pS curve are reached in the wild-type and in various *Dm*AChE mutants. The number corresponds to the sequence of the mature protein and the number in parenthesis corresponds to the Torpedo numeration. (Bold, pS curves of mutants shown in Fig. 2.)

Mutant	Optimum	Inflexion point	Mutant	Optimum	Inflexion point
Wild-type	1.19	38.6	W321(279)A	5.01	50.6
E69(70)A	1.23	40.8	W321(279)L	6.17	26.1
E69(70)I	0.98	39.9	Y324(282)A	0.79	46.3
E69(70)L	1.72	40	L328(288)A	1.08	54.8
E69(70)K	6.19	88	L328(288)F	1.76	40.7
E69(70)W	1.38	98.7	F330(290)A	3.20	117.4
E69(70)Y	2.65	22.1	F330(290)C	1.68	132.5
R70(71)V	12.92	85.7	F330(290)G	4.31	23
Y71(72)A	2.69	58.4	F330(290)H	1.25	20.5
Y71(72)D	7.4	175	F330(290)I	1.44	85.8
Y71(72)K	5.47	25.6	F330(290)L	1.54	15.2
Y73(74)A	0.97	59.7	F330(290)S	2.52	19.7
Y73(74)Q	1.86	69	F330(290)V	2.85	36.6
F77(78)S	3.25	39.7	F330(290)W	4.01	49.8
W83(84)A	16	218	F330(290)Y	2.86	35.2
W83(84)E	32	144	G368(328)A	3.33	57.3
W83(84)Y	1.83	26.3	Y370(330)A	4.66	99.5
M153(129)A	2.01	81.7	Y370(330)C	31.65	1114
I161(137)K	1.15	47.2	Y370(330)F	0.69	117.7
I161(137)T	0.48	3.7	Y370(330)L	4.67	32.5
Y162(138)A	21.1	85.1	Y370(330)P	4.01	245.5
V182(158)L	1.25	72.7	Y370(330)S	1.88	152
E237(199)A	5.3	129.4	F371(331)A	3.07	19.8
E237(199)G	7.34	112.3	F371(331)G	3.37	68.4
E237(199)Q	2.25	31.3	F371(331)Y	8.76	308.9
G265(227)A	2.72	74.5	Y374(334)A	1.52	68.2
W271(233)G	13.2	185.1	D375(335)G	1.19	49
V318(276)A	1.26	39.2	D375(335)A	1.74	22.7
V318(276)D	1.43	61.4	D375(335)d	2.87	40.7

Chemicals

Acetylcholine, acetylthiocholine (ATCh), were purchased from Sigma. Carbaryl, 1-naphthylmethylcarbamate, was purchased from Cil Cluzeau Info Labo (Sainte-Foi-La-Grande, France) and the substrate analogue, 4-ketoamyl trimethyl ammonium iodide was purchased from MP biochemicals (<http://www.icnbiomed.com/>) (Fig. 1).

Kinetics of substrate hydrolysis

Kinetics were followed at 25 °C in 25 mM phosphate buffer, pH 7, 1 mg·mL⁻¹ BSA, at low and high ionic strength (substrate + NaCl at 300 mM). Hydrolysis of ATCh iodide was followed spectrophotometrically at 412 nm using the method of Ellman *et al.* [25], at substrate concentrations ranging from 2 µM to 300 mM, in 1 cm path length cuvettes. Activity was measured for 1 min after addition of the enzyme to the mixture, and spontaneous hydrolysis of substrate was subtracted. Data were analyzed by multiple nonlinear regression. The values for the optimum activity, and inflexion point leading to total inhibition were calculated numerically by taking the first and the second derivatives, respectively, of theoretical pS curves. They were

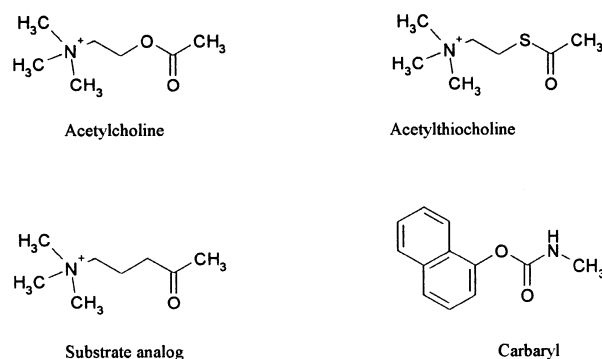


Fig. 1. Chemical formulae of the compounds used.

obtained by fitting the equation of the rational fourth degree polynomial to the initial rate data of each mutant because such a polynomial was the equation with the lowest complexity to describe the wild-type pS curve. As only data for substrate hydrolysis were available for the mutated enzymes, reaction steps could not be estimated due to correlations between parameters.

Determination of the decarbamylation rate constant of AChE

Enzyme was incubated at 25 °C with 0.1 mM carbaryl in 25 mM phosphate buffer, pH 7, 1 mg·mL⁻¹ BSA until more than 95% of the enzyme was inhibited. The mixture was loaded on a gel filtration column (P10, Pharmacia) and eluted with 25 mM phosphate buffer, pH 7, 1 mg·mL⁻¹ BSA. Fractions with enzyme were collected. The decarbamylation rate of the enzyme was studied in the presence of different concentrations of substrate analogue (from 10 µM to 100 mM), at 25 °C, in 25 mM phosphate buffer, pH 7, 1 mg·mL⁻¹ BSA with or without NaCl (substrate analogue + NaCl at 300 mM). The degree of decarbamylation was followed for 9 h by sampling aliquots of the reaction mixture and estimating free enzyme concentration spectrophotometrically by its activity against 10 mM ATCh. The reactivation could be described by a simple first-order rate equation. The decarbamylation rate constant (*kr*), was calculated by nonlinear regression analysis using Eqn (1):

$$[E]_t = [Ec]_0(1 - e^{-kr \cdot t}) + [E]_0 \quad (1)$$

where $[E]_t$ represents the free enzyme concentration at time *t*, $[E]_0$ the initial concentration of free enzyme and $[Ec]_0$ the initial concentration of mono-methylcarbamoylated enzyme.

Results

Location of residues involved in substrate inhibition

To determine the residues involved in inhibition by excess substrate, we employed *in vitro* site-directed mutagenesis of residues lining the active-site gorge. These positions were changed to various amino acids (Table 1) with the previous objective of engineering an AChE, sensitive to insecticides, which could be used to detect residuals in the environment

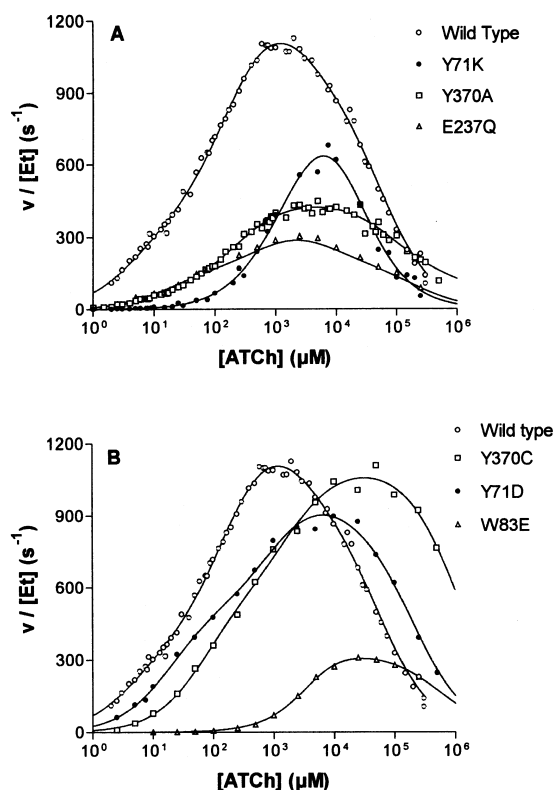


Fig. 2. pS-curves for ATCh hydrolysis by: (A) E237Q, Y71K and Y370A mutants; (B) W83E, Y71D and Y370C mutants at low ionic strength. The curves are theoretical, obtained by fit of the equation of rational fourth degree polynomial to the data.

[26,27]. All the enzymes analyzed exhibited more than 5% of the wild-type *DmAChE* activity, including active-site tryptophan mutants (Trp83). In all the mutants, we observed inhibition at high substrate concentration as evidenced by the existence of optima and inflexion points (Table 1). For comparison, substrate concentrations at the inflexion points represent approximately the values of K_{ss} estimated by using the Haldane equation [28]. Even the enzymes with substitution at positions 71, 237 or 370 were inhibited (Fig. 2A), whereas analogous mutants in vertebrate AChE were not [15,29]. However, in some cases (Y71D, W83E and Y370C), we observed a shift of inhibition towards higher substrate concentrations (Fig. 2B). Inhibition appears to be total, although, with some mutants, we observed relatively high activity even at the highest substrate concentration used (0.3 M).

Inhibition of the decarbamylation rate by excess substrate analogue

There are several hypotheses that can explain inhibition by excess substrate. One of them is a decrease of the deacetylation rate upon binding the substrate molecule to the acetylated enzyme [19]. If this were so, a decrease of the decarbamylation rate would be expected at high substrate concentrations. To test this hypothesis, we measured the decarbamylation rate of the wild-type enzyme in presence of substrate analogue (Fig. 1) at concentrations ranging

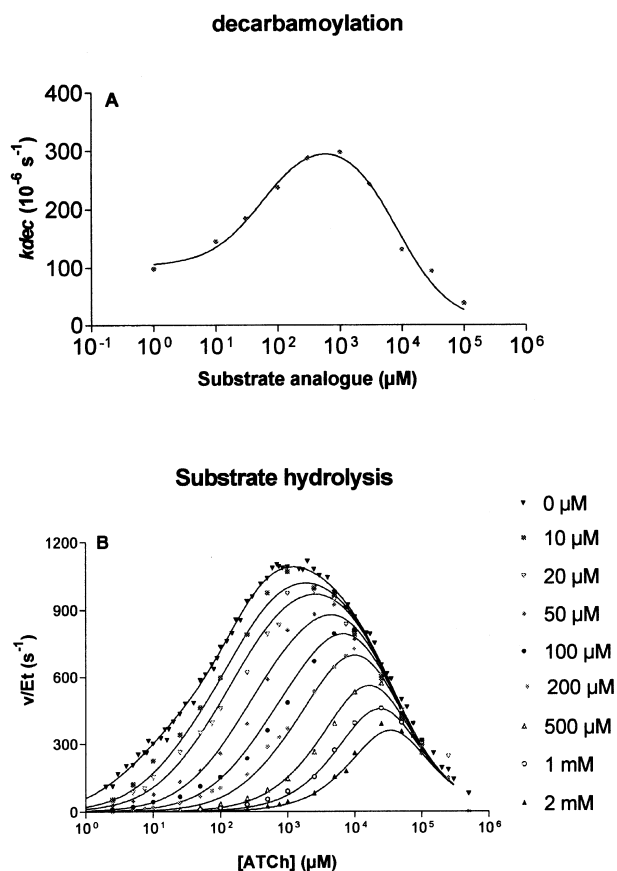


Fig. 3. Inhibition of decarbamylation and substrate hydrolysis by substrate analogue. (A) Decarbamylation rate of wild-type *DmAChE* as a function of different concentrations of substrate analogue (values are the average of at least five independent measurements). (B) pS-curves for ATCh hydrolysis by wild-type AChE in the presence of different concentrations of substrate analogue. The curves are theoretical, obtained by simultaneous fit of the two equations to the data (substrate hydrolysis and decarbamylation in presence of substrate analogue).

from 0 to 100 mM. The analogue was used instead of the substrate to avoid decarbamylation due to transcarbamoylation by the choline, generated from the substrate hydrolyzed by the noncarbamoylated fraction of the enzyme. Figure 3 shows activation of the decarbamylation rate at low substrate analogue concentrations as reported already [7], followed by the inhibition at high concentrations. The same pattern was found in the presence of 300 mM NaCl showing that increased ionic strength at high substrate concentrations does not influence activation and/or inhibition (diagram not shown).

Inhibition of substrate hydrolysis by substrate analogue

To get additional information on inhibition by excess substrate, we analyzed the inhibition of substrate hydrolysis by the substrate analogue (Fig. 3B). As expected, the addition of substrate analogue affects activity at low substrate concentrations and has virtually no effect at high substrate concentrations. Moreover, a decrease and displacement of the optimum towards higher substrate

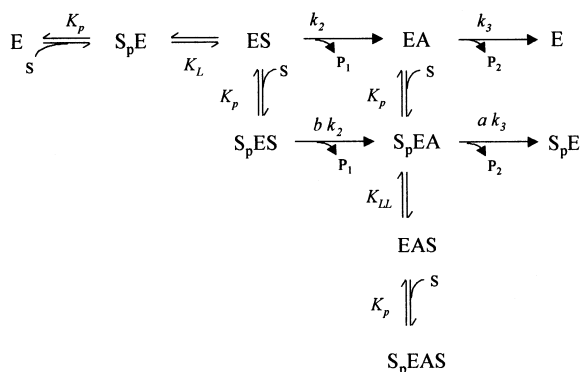


Fig. 4. Reaction scheme for the hydrolysis of ATCh. E represents the free AChE, EA the acetylated enzyme and S the substrate. When a ligand is bound to the peripheral site, it is written on the left of E with the subscript 'p' added (S_pE). When a ligand is bound at the catalytic site, the symbol is written on the right of E (ES). *Per analogiam*, S_pEAS means that a substrate molecule is at the peripheral site and another substrate molecule at the acylation site of acetylated enzyme.

concentrations was observed with increasing analogue concentrations.

In order to interpret the effects of substrate analogue on decarbamylation and ATCh hydrolysis, we tested several kinetic models, all taking into account the existence of the Michaelis complex and the acetylated-enzyme. The simplest model, which gave satisfactory results, is presented in Fig. 4. It is based on two assumptions: (a) two substrates (or substrate analogues) molecules can bind simultaneously to the free and the acetylated enzyme as shown by structural studies [30] and (b) the occupation of the anionic subsite at the bottom of the active-site blocks deacetylation as shown by our decarbamylation experiment and as supported by structural studies of soman aged human butyrylcholinesterase [31].

Following this model, the substrate initially binds to the peripheral site, mainly consisting of Trp321, at the entrance of the active-site gorge, thereby giving the complex S_pE . Gliding down the gorge to the catalytic site results in formation of a Michaelis addition complex (ES), thus setting free the peripheral site for another substrate molecule to give a ternary complex (S_pES). The enzyme is acetylated to yield the acetylated enzyme EA (and S_pEA), and during this step, choline is released. During the next step, a water molecule approaches the esteratic bond and induces deacetylation to regenerate the free enzyme (E). Binding of another substrate molecule to the peripheral site of the Michaelis complex, leading to S_pES , reduces acetylation of the catalytic serine ($b < 1$, Fig. 4). This binding indeed blocks the choline exit after the breakdown of the substrate; the choline is reacylated, and as result, the overall acetylation process is slowed down. Ligand binding at the peripheral site of the acetylated enzyme enhances the approach of water and increases deacetylation ($a > 1$, Fig. 4). However, the substrate molecule bound to the peripheral site can also enter deeper in the gorge of the acetylated enzyme (K_{LL}) thus giving the EAS complex. At this stage, no water molecule can draw near to the esteratic bond and, in consequence, the substrate molecule completely blocks

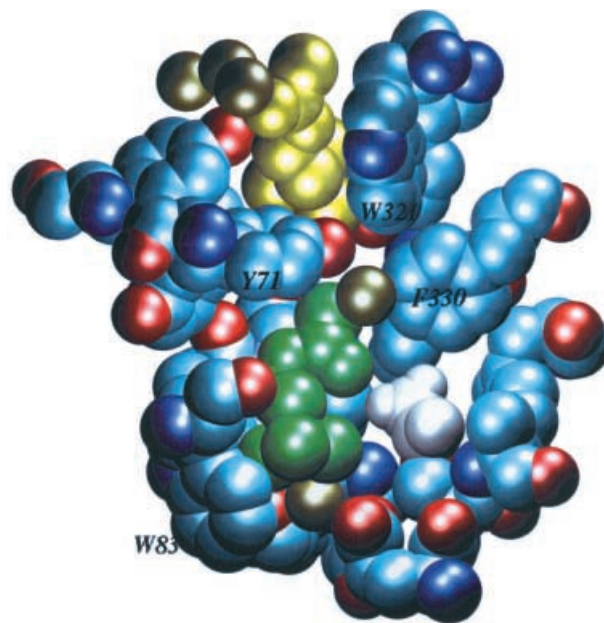


Fig. 5. 3D-visualization of the S_pEAS complex in the active-site of wild-type *Drosophila melanogaster* AChE. Substrate molecules at the bottom of the gorge and at the peripheral site are in green and in yellow, respectively. Dark blue, red and light blue atoms represent nitrogen, oxygen and carbon, respectively; oxygen atoms of water molecules are in gold; white atoms represent the acyl moiety of the Ser238. Position of the ligands was modelled according to the position of decametonium trimethylammonium groups [49]. The structure was optimized using mixed quantum and molecular mechanic algorithms using CHARMM, where the two substrate molecules, acetate and active serine residue were treated quantum mechanically [51].

deacetylation. Finally, if another substrate molecule binds to the peripheral site, a ternary complex between acetylated enzyme and two substrate molecules is formed (S_pEAS) (visualization in Fig. 5). A substrate analogue can substitute for the substrate in all but the chemical steps, with different binding affinities due to the replacement of the oxygen atom by a methylene group.

The results were evaluated by fitting simultaneously the equation for decarbamylation and the derived steady-state equation to the two different data sets: decarbamylation rate data and initial rate data in the absence and presence of substrate analogue (Fig. 3). In this analysis, we treated binding and gliding steps as if in equilibrium, thus, using mixed equilibrium and steady-state assumptions. This solution was first applied for the analysis of decarbamylation because it is very slow. The evaluated constants are therefore true equilibrium constants. Later, when we tested the model for substrate hydrolysis using pure nonequilibrium assumptions, we were able to obtain a value for the substrate analogue peripheral site binding constant (K_{ip}), which was identical to the value estimated from decarbamylation experiments only by setting association and dissociation rate constants in the range compatible with equilibrium treatment. The results obtained with this model are listed in Table 2. It was possible to find another satisfactory solution. For the discrimination, we used two criteria: a solution should first give a low residual least

Table 2. Values of individual kinetic constants obtained by the simultaneous fit of equations, derived from reaction schemes presented in Fig. 4, to the data for the inhibition of substrate hydrolysis and decarbamylation by the substrate analogue.

Constant	Substrate	Substrate analogue	Carbamoyl enzyme
k_2 (s ⁻¹)	19400 ± 4400	–	–
k_3 (s ⁻¹)	400 ± 50	–	138 ± 6 10 ⁻⁶
K_p (μM)	190 ± 30	100 ± 20	–
K_L	1 ± 0.4	0.044 ± 0.013	–
K_{LL}	130 ± 30	75 ± 20	–
a	4.2 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b
b	0.16 ± 0.02 ^c	0.15 ± 0.05 ^c	–

^a Acceleration of deacetylation by substrate and substrate analogue. ^b Acceleration of decarbamylation by substrate analogue. Acceleration of deacetylation and decarbamylation by substrate analogue were fitted together. ^c Inhibition of acetylation by substrate analogue.

square sum, and second, yield similar values for the substrate and the substrate analogue kinetic parameters regarding the most putative reaction steps. The solution presented in Table 2 fulfils both criteria, except for the value of K_L . A logical explanation is that the substrate analogue binds tightly to the oxyanion hole [30], while the substrate at the same position will be cleaved; hence the partition coefficient of the substrate (K_L) represents also the proportion of nonproductive substrate orientations in the gorge. Additionally, we can note that the analogue is more hydrophobic than the substrate itself and will thereby bind more tightly to the aromatic gorge.

Discussion

We here propose a model for the reaction mechanism that explains inhibition by excess of substrate in cholinesterases. Our main assumption is that the binding of a substrate molecule to the acetylated enzyme, within the active-site gorge, blocks deacetylation by sterically hindering the access of water to the esteratic bond. This mechanism is additional to the blockade of choline exit by a substrate bound at the peripheral site. We have tested this hypothesis with *D. melanogaster* AChE, which displays, at intermediate substrate concentrations, higher activities than would be expected for a Michaelis–Menten mechanism, and which can, also, be completely inhibited by excess of substrate.

Location of the substrate inhibition site

It has been suggested that the inhibition binding site could be located at the rim of the active-site gorge, at a site called the 'peripheral anionic site'. The first support for this assumption came from the identification of a peripheral binding site for noncompetitive inhibitors such as propidium and fasciculins. High concentrations of acetylcholine, causing substrate inhibition, affects the binding of these two ligands, indicating that the substrate inhibition binding site, and the propidium and the fasciculins-binding sites overlap [11,16]. The second argument in favour of the location of the inhibition binding site at the rim of the

active-site gorge came from *in vitro* mutagenesis experiments. Shafferman *et al.* [15] found that some mutations at the rim of the gorge could generate enzymes in which inhibition by high substrate concentrations was partially or completely eliminated, leading to the hypothesis that peripheral and substrate inhibition sites would overlap.

However, some data suggest that the inhibition binding site might not be located at the rim of the active-site gorge. From recent competition experiments with fasciculins, the affinity of acetylcholine for the peripheral anionic site of human erythrocyte AChE has been estimated to be 1 mM, a dissociation constant that corresponds numerically to the optimum activity [32] and not to the inhibition. With *Dm*AChE, substitution of residues located at the rim of the gorge did not change the inhibition by excess substrate, even when mutating the residues which were involved in the binding site of Triton X-100, D-tubocurarine and propidium, i.e. residues Glu69, Asp375 and Trp321, respectively. This result is in agreement with the observation of substrate inhibition phenomenon on chicken AChE, which lacks a propidium binding site [18], and with site-directed mutagenesis data on mouse and *Bungarus fasciatus* AChEs: mutations which drastically affect the binding of propidium do not affect inhibition by excess substrate [17,33].

A logical possibility is that substrate inhibition originates from the bottom of the active-site. Some mutations located in this region have already been identified as influencing the inhibition by excess substrate. Torpedo E199Q AChE, mouse F297I AChE and human Y337A AChE were not inhibited at high substrate concentrations [15,28,34]. In *Dm*AChE, mutations of Trp83 and Tyr370, which are located at the bottom of the gorge and play a key role in the recognition of the quaternary ammonium moiety of ACh, show significant shift of inhibition towards higher concentrations (Fig. 2B). According to all these results, substrate inhibition involves different residues lining the active-site gorge, from the top to the bottom, and disruption of only a part of this gorge by *in vitro* mutagenesis cannot completely eliminate substrate inhibition. Thus, substrate inhibition seems to be a general property of buried active-sites (cf. alcohol dehydrogenase [35]), more pronounced with the narrowness of the site: weak in butyrylcholinesterase with a large active-site and strong in *Dm*AChE with a narrow active-site.

Substrate inhibition originates from the inhibition of the deacetylation rate and from steric hindrance of product exit – the first hypothetical mechanism was expounded in the sixties after the existence of an acetylenzyme intermediate was proposed. It was postulated by Krupka and Laidler that inhibition of AChE by substrate resulted from the inhibition of deacetylation [19]. This would arise from the combination of acetylcholine with the acetylenzyme at the anionic site at the bottom of the gorge, which is set free after the release of the choline. Such a binding would prevent deacetylation of the acetylenzyme by hindering the approach of a water molecule to the acetylated serine. By showing that acetylcholine and some reversible inhibitors block decarbamylation, Wilson and Alexander supported this theory [36]. The determination and the comparison of acetylation and deacetylation rate constants, again, upheld this hypothesis. Indeed, the deacetylation rate is lower than the acetylation rate and there is a substantial steady-state

level of acetylated enzyme for marked substrate inhibition to occur [31,37]. Our results are in accordance with this mechanism as we observed inhibition of the decarbamylation rate by high concentrations of substrate analogue (Fig. 3). The existence of another mechanism for substrate inhibition has been proposed by the group of T.L. Rosenberry. They have suggested that substrate inhibition occurs from a steric hindrance created by product exit when another molecule is bound to the peripheral site [38]. Careful inspection of the pS curve for *Dm*AChE (Fig. 3) shows two different components in the inhibition, one at substrate concentrations just above optimum and the other at very high substrate concentrations. Thus, we attributed the two components of the curve to the two substrate inhibition mechanisms of the proposed scheme (Fig. 4), steric hindrance of the choline exit and blockade of deacetylation, respectively.

Substrate at the peripheral site does not completely block the exit of choline reinforcing the hypothesis of the existence of a backdoor

Results obtained by the analyses of our data also suggest that there is only a partial blocking of choline exit. The value of $b = 0.15$ is significantly different from zero and reflects the blocking of choline exit by the substrate molecule bound at the peripheral site. If choline remains blocked at the bottom of the gorge, the reverse reaction occurs, the choline is acetylated and the apparent deacetylation is reduced [39]. This partial blocking might reflect an alternative way for the exit of choline by a backdoor, as proposed with analogy to lipase [40]. At least two pieces of experimental evidence support the backdoor hypothesis: the change of acrylodan fluorescence spectra of distinctive omega-loop sites in mouse AChE [41] and the absence of the eseroline leaving group in the crystallographic view of the fully occupied carbamoylated gorge of *Tc*AChE [42]. Furthermore, the existence of such rapid omega-loop movements could also permit the entrance of the substrate, as supported by simulation [40] and by the residual activity of vertebrate AChEs in presence of great excess of fasciculin, which completely covers the main entrance of the active-site [43–45]. The value of b is small, suggesting that the exit of product by the back door constitutes only a low proportion of the traffic. This would explain why closing the backdoor with ionic or covalent bonds did not result in a significant change of catalytic activity [46,47].

Effect of occupying the peripheral site on the binding of ligands at the catalytic site

Binding of a ligand to the peripheral site most probably affects the affinity of ligands at the catalytic site. It was shown that bound propidium or gallamine decreased association and dissociation rate constants for both acylation site ligands and for substrate [38]. Similarly, we observed a decrease of phosphorylation rate by hemi-substrates in the presence of peripheral ligands such as Triton X-100 and propidium [6,7]. However, it was found in cholinesterases from various species, that small hemi-substrates are enhanced in their association with active serine in the presence of bulky peripheral ligands such as propidium and D-tubocurarine:

the entrance rate of small substrates, such as methamidophos, aldicarbo or methanesulfonylfluoride, is reduced but much less than their exit rate, resulting in increased affinity [46,48]. In other words, it appears that occupation of the peripheral site decreases the affinity for large ligands and increases the affinity for small ones.

Upon binding of a substrate molecule to the peripheral site, the same explanation should also apply to the water molecule involved in deacetylation, as this water can then be considered as a small substrate. Up to 1 mM, increasing concentrations of substrate analogue increases the decarbamylation rate. The binding of the substrate analogue, at the peripheral site, might increase the probability for the water molecule to reach the productive position for hydrolysing the esteratic bond. In the model, the factor ' a ' represents the enhanced probability of water approach to the carbamoylated or acetylated serine. It is larger than one, when the active-site gorge accessibility is hampered by a ligand at the peripheral site. This can be explained in terms of transition state theory as follows. It is believed that water molecules in the active-site of cholinesterases are cluster-oriented. A ligand binding to the peripheral site disrupts this cluster. Consequently, one part of the water molecule is released in bulk, but the second part is captured below the ligand in a newly formed cavity. The entropy gain, accounted for by the first part is used to combine acetylated enzyme complex with one of the captured water molecules. The energetic cost of immobilizing the 'active water', i.e. the lowering of the barrier, is thus provided by those which are released. It can be estimated easily that a fourfold increase in deacetylation rate ($\approx 3.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ at 298K) can be gained by the release of only one water molecule of hydration immobilized in a crystal or mineral (between zero and $8.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ at 298K) [50]. This hypothesis is in accordance with the observation of Harel *et al.* [51] on the complex structure of *Tc*AChE with TMTFA, a transition state analogue of ACh. Indeed, upon binding of this compound, six water molecules found in the native structure are displaced. The authors state that the dry and confined environment in which the transition state forms could be responsible for the high catalytic power of AChE. Upon binding of a ligand to the peripheral site, the active-site gorge of AChE gets virtually full and the probability for the water to reach its productive position for hydrolysis of the esteratic bond will increase, given the confinement and the low water content of the gorge. In kinetic terms, the binding of a substrate molecule to the peripheral site increases the 'affinity' of the active water molecule for the acetylated catalytic serine, by capturing water molecules at the bottom of the gorge.

In conclusion, our data suggest that the peripheral site is only partially responsible for the inhibition by excess substrate in *Dm*AChE. According to the proposed reaction scheme, the substrate always binds at the peripheral site and then slides to the bottom where it is hydrolyzed. When the catalytic site is acetylated, the binding at the peripheral site closes the gorge, resulting in an increased deacetylation by enhancing the affinity of the water molecule involved in catalysis; if the substrate molecule slides down the gorge to the active-site before the catalytic serine is deacetylated, its new position at the bottom then blocks the deacetylation (Fig. 5).

Acknowledgements

This research was supported by grants from CEE (ACHEB, QLK3-CT-2000-00650 and SAFEGUARD, QLK3-CT-2000-000481) and from DGA (PEA 99CO029).

References

- Wilson, I.B. & Cabib, E. (1956) Acetylcholinesterase: enthalpies and entropies of activation. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 202–207.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. & Silman, I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**, 872–879.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I. & Sussman, J.L. (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.* **9**, 1063–1072.
- Marcel, V., Gagnoux-Palacios, L., Pertuy, C., Masson, P. & Fournier, D. (1998) Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem. J.* **329**, 329–334.
- Estrada-Mondaca, S., Lougarre, A. & Fournier, D. (1998) Modification of the primary sequence of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase to increment *in vitro* expression. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **38**, 84–90.
- Marcel, V., Estrada-Mondaca, S., Magné, F., Stojan, J., Klæbe, A. & Fournier, D. (2000) Exploration of the *Drosophila* acetylcholinesterase substrate activation site using a reversible inhibitor, Triton X-100 and mutated enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 11603–11609.
- Brochier, L., Pontie, Y., Willson, M., Estrada-Mondaca, S., Czaplicki, J., Klæbe, A. & Fournier, D. (2001) Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **276**, 18296–18302.
- Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F., Froment, M.-T., Schopfer, L.M. & Lockridge, O. (1997) Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **36**, 2266–2277.
- Tara, S., Elcock, A.H., Kirchhoff, P.D., Briggs, J.M., Radic, Z., Taylor, P. & McCammon, J.A. (1998) Rapid binding of a cationic active site inhibitor to wild type and mutant mouse acetylcholinesterase: Brownian dynamics simulation including diffusion in the active site gorge. *Biopolymers* **46**, 465–474.
- Mallender, W.D., Szegletes, T. & Rosenberry, T.L. (2000) Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry* **39**, 7753–7763.
- Radic, Z., Reiner, E. & Taylor, P. (1991) Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol. Pharmacol.* **39**, 98–104.
- Marchot, P., Khelif, A., Ji, Y.H., Mansuelle, P. & Bougis, P.E. (1993) Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.* **268**, 12458–12467.
- Saxena, A., Hur, R. & Doctor, B.P. (1998) Allosteric control of acetylcholinesterase activity by monoclonal antibodies. *Biochemistry* **37**, 145–154.
- Radic, Z., Gibney, G., Kawamoto, S., MacPhee-Quigley, K., Bongiorno, C. & Taylor, P. (1992) Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants. *Biochemistry* **31**, 9760–9767.
- Shafferman, A., Velan, B., Ordentlich, A., Kronman, C., Grosfeld, H., Leitner, M., Flashner, Y., Cohen, S., Barak, D. & Ariel, N. (1992) Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.* **11**, 3561–3568.
- Radic, Z., Duran, R., Vellom, D.C., Li, Y., Cervenansky, C. & Taylor, P. (1994) Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **15**, 11233–11239.
- Cousin, X., Bon, S., Duval, N., Massoulié, J. & Bon, C. (1996) Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom. A new type of COOH-terminal domain; involvement of a positively charged residue in the peripheral site. *J. Biol. Chem.* **271**, 15099–15108.
- Eichler, J., Anselmet, A., Sussman, J.L., Massoulié, J. & Silman, I. (1994) Differential effects of 'peripheral' site ligands on *Torpedo* and chicken acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **45**, 335–340.
- Krupka, R.M. & Laidler, K.J. (1961) Molecular mechanisms for hydrolytic enzyme action. I. Apparent non-competitive inhibition, with special reference to acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1448–1454.
- Hodge, A.S., Humphrey, D.R. & Rosenberry, T.L. (1992) Ambenonium is a rapidly reversible noncovalent inhibitor of acetylcholinesterase, with one of the highest known affinities. *Mol. Pharmacol.* **41**, 937–942.
- Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, J.P., Ravallec, M., Devauchelle, G. & Cérutti, M. (1994) Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculovirus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **203**, 734–742.
- Estrada-Mondaca, S. & Fournier, D. (1998) Stabilization of recombinant *Drosophila* acetylcholinesterase. *Protein Expr. Purif.* **12**, 166–172.
- Levy, D. & Ashani, Y. (1986) Synthesis and *in vitro* properties of a powerful quaternary methylphosphonate inhibitor of acetylcholinesterase. A new marker in blood-brain barrier research. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1079–1085.
- Haas, R., Marshall, T.L. & Rosenberry, T.L. (1988) *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycosylphospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* **27**, 6453–6457.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Feathersone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95.
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S. & Fournier, D. (2002) Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng.* **15**, 43–50.
- Devic, E., Li, D., Dauta, A., Henriksen, P., Codd, G.A., Marty, J.-L. & Fournier, D. (2002) Detection of anatoxin-a (s) in environmental samples of cyanobacteria using a biosensor with engineered acetylcholinesterases. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, 4102–4106.
- Reiner, E. & Simeon-Rudolf, V. (2000) Cholinesterase: substrate inhibition and substrate activation. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **440**, R118–R120.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K. & Taylor, P. (1990) Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 7546–7550.
- Colletier, J.-P., Fournier, D., Greenblat, H.M., Sussman, J.L., Zaccari, G., Silman, I. & Weik, M. (2002) Structural studies on *Torpedo californica* acetylcholinesterase in complex with a substrate analogue. *Proceedings of the 7th International Meeting on Cholinesterase*, 8–12 Nov 2002, pp. 56–57. Pucon.
- Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.-C. & Nachon, F. (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **278**, 41141–41147.

32. Szegeletes, T., Mallender, W.D., Thomas, P.J. & Rosenberry, T.L. (1999) Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* **38**, 122–133.
33. Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D., Camp, S. & Taylor, P. (1993) Three distinct domains distinguish between acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase substrate and inhibitor specificities. *Biochemistry* **32**, 12074–12084.
34. Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S. & Taylor, P. (1993) Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* **32**, 12–17.
35. Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R. & Ladenstein, R. (1999) The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **289**, 335–355.
36. Wilson, I.B. & Alexander, J. (1962) Acetylcholinesterase: irreversible inhibitors, substrate inhibition. *J. Biol. Chem.* **237**, 1323–1326.
37. Froede, H.C. & Wilson, I.B. (1984) Direct determination of acetyl-enzyme intermediate in the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. *J. Biol. Chem.* **259**, 11010–11013.
38. Szegeletes, T., Mallender, W.D. & Rosenberry, T.L. (1998) Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry* **37**, 4206–4216.
39. Wilson, I.B., Bergmann, F. & Nachmansohn, D. (1950) Acetylcholinesterase. X. Mechanism of the catalysis of acylation reactions. *J. Biol. Chem.* **186**, 781–790.
40. Gilson, M.K., Straatsma, T.P., McCammon, J.A., Ripoll, D.R., Faerman, C.H., Axelsen, P.H., Silman, I. & Sussman, J.L. (1994). Open 'back door' in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **263**, 1276–1278.
41. Shi, J., Boyd, A.E., Radic, Z. & Taylor, P. (2001) Reversibly bound and covalently attached ligands induce conformational changes in the omega loop, Cys69-Cys96, of mouse acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **276**, 42196–42204.
42. Bartolucci, C., Perola, E., Cellai, L., Brufani, M. & Lamba, D. (1999) 'Back door' opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry* **38**, 5714–5719.
43. Bourne, Y., Taylor, P. & Marchot, P. (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* **83**, 503–512.
44. Harel, M., Kleywegt, G.J., Ravelli, R.B., Silman, I. & Sussman, J.L. (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase–fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* **3**, 1355–1366.
45. Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A., Kronman, C., Barak, D., Ariel, N., Shafferman, A., Silman, I. & Sussman, J.L. (2000) Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1385–1394.
46. Radic, Z. & Taylor, P. (1999) The influence of peripheral site ligands on the reaction of symmetric and chiral organophosphates with wildtype and mutant acetylcholinesterases. *Chem. Biol. Interact.* **119–120**, 111–117.
47. Kronman, C., Ordentlich, A., Barak, D., Velan, B. & Shafferman, A. (1994) The 'back door' hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 27819–27822.
48. Golčnik, M., Fournier, D. & Stojan, J. (2002) Acceleration of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase methanesulfonylation: peripheral ligand D-tubocurarine enhances the affinity for small methanesulfonyl fluoride. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 145–157.
49. Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P., Silman, I. & Sussman, G. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9031–9036.
50. Fersht, A.R. (2002) *Structure and Mechanism in Protein Science*. Chap. 2, p. 69. W.H. Freeman, New York.
51. Harel, M., Quinn, D.M., Haridasan, K.N., Silman, I. & Sussman, J.L. (1996) The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2340–2346.
52. Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamic calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187–217.

Supplementary material

The following material is available from <http://blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/EJB/EJB4048/EJB4048sm.htm>

Appendix. Analysis of decarbamylation rate and substrate hydrolysis

Fig. S1. Schemes for analysis of data.

Conformational Flexibility in the Peripheral Site of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor

Jacques Ph. Colletier,[†] Benoît Sanson,[†] Florian Nachon,[‡] Emanuele Gabellieri,^{§,||}
Caterina Fattorusso,^{||,⊥} Giuseppe Campiani,^{§,||} and Martin Weik^{*,†}

Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France,
Unité d'Enzymologie, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, BP87-38702 La Tronche, France,
Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, via Aldo Moro, Università di Siena, 53100 Siena, Italy,
European Research Centre for Drug Discovery and Development, University of Siena, Italy, Dipartimento di
Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli Federico II, via D. Montesano 49, 80131 Napoli, Italy

Received December 22, 2005; E-mail: martin.weik@ibs.fr

X-ray crystallography is a powerful tool that provides time-averaged pictures of biological macromolecules. These seemingly static structures are in reality animated by molecular motions stemming from transitions between substates in a conformational energy landscape.¹ This landscape is characterized by a very large number of conformational substates, the population of which depends on their free energy. A crystallographic structure represents only the predominant substate of a molecule, and minor populations can usually not be assessed. Yet, the understanding of biological function on a molecular level requires knowledge about both structural and dynamical aspects of, e.g., an enzyme. This is particularly obvious for acetylcholinesterase (AChE), the active site of which is accessed by a deep and narrow gorge² that makes "breathing" motions essential for traffic of substrates and products to occur.³ Here, we report the X-ray crystallographic structure of AChE from *Torpedo californica* (TcAChE) in complex with a gorge-spanning inhibitor, NF595⁴ (Figure 1). NF595 has been synthesized with a view to developing a new generation of anti-Alzheimer drugs, interacting with both the active and peripheral binding sites of AChEs. Surprisingly, and for the first time in TcAChE, a major conformational change is observed upon complexation in the peripheral substrate-binding site. We suggest that this conformational substate is part of the equilibrium dynamics of the native enzyme and that it has been selected by inhibitor binding.

AChE is one of nature's fastest enzymes. Essential in the process of signal transmission in cholinergic synapses, AChE is responsible for the breakdown of the neurotransmitter acetylcholine into acetate and choline.⁵ It is the target of all currently approved anti-Alzheimer drugs, of insecticides, and of chemical warfare agents. The first structure of an AChE revealed the buried nature of the active site and a peripheral substrate-binding site at the entrance of the gorge near the enzyme's surface² (Figure 2a). Numerous structures of TcAChE in complex with various inhibitors have been solved, providing insights into inhibitor-induced conformational changes.⁵ The conformation of the active-site gorge appears to be highly conserved, and the observed structural changes are small, except for those of Phe330.

Trigonal crystals of TcAChE² were soaked into the mother liquor solution containing 2 mM NF595, loop-mounted, and flash-cooled

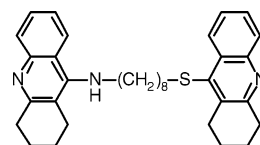


Figure 1. Structure of NF595 (referred to as compound 3h in ref 4). The heterodimer bears a tacrine moiety and a sulfur-containing tetrahydroacridine system connected by a 8-methylene linker.

at 100 K; diffraction data were collected on beamline ID14-EH2 at the European Synchrotron Radiation Facility. Structure refinement to a resolution of 2.2 Å included rigid body refinement, simulated annealing, energy minimization, and individual B-factor refinement (PDB accession code 2CEK).

NF595 spans the gorge, in agreement with previous docking studies,⁴ and binds at the peripheral and the active sites (Figure 2b). Both heteroaromatic moieties are engaged in π - π stacking interactions with two aromatic residues, i.e. with Trp84 and Phe330 in the lower part of the gorge, and with Trp279 and Tyr70 at the peripheral site. To make this parallel stacking mode possible, the side chains of both Phe330 and Trp279 rotate by about 90° with respect to their native positions. Whereas Phe330 is known to be a mobile residue, the conformational change of Trp279 has never been observed before in TcAChE.

Bourne and collaborators recently determined the structure of mouse AChE (mAChE) in complex with a bifunctional inhibitor (*syn*1 TZ2PA6) formed by in situ click chemistry.⁶ This complex also revealed a 90° rotation of the mAChE Trp286, equivalent to TcAChE Trp279, the key constituent of AChEs peripheral site. In the mAChE complex, Trp286 reorients in such a way that it is exposed to the solvent, whereas in the TcAChE complex, Trp279 draws back toward the inside of the gorge. The two inhibitor-induced conformations of the peripheral-site tryptophan residues are thus 180° apart (Figure 2c). This conformational difference might be due either to the different inhibitors used or to the different packing patterns in crystals of TcAChE and mAChE. The peripheral-site architecture in AChEs from different species, including mAChE, TcAChE, and human AChE, is structurally conserved. Therefore, the inhibitor-induced conformations of Trp279 in TcAChE and of Trp286 in mAChE are most probably part of a common energy landscape. They illustrate the wide range of conformations accessible to a functionally important residue. A smaller movement of Trp279 has also been observed in the crystal structure of TcAChE in complex with DFP, in which a loop comprising this residue undergoes a conformational change.⁷

[†] Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale.

[‡] Unité d'Enzymologie, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées.

[§] Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, via Aldo Moro, Università di Siena.

^{||} European Research Centre for Drug Discovery and Development, University of Siena.

[⊥] Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli Federico II.

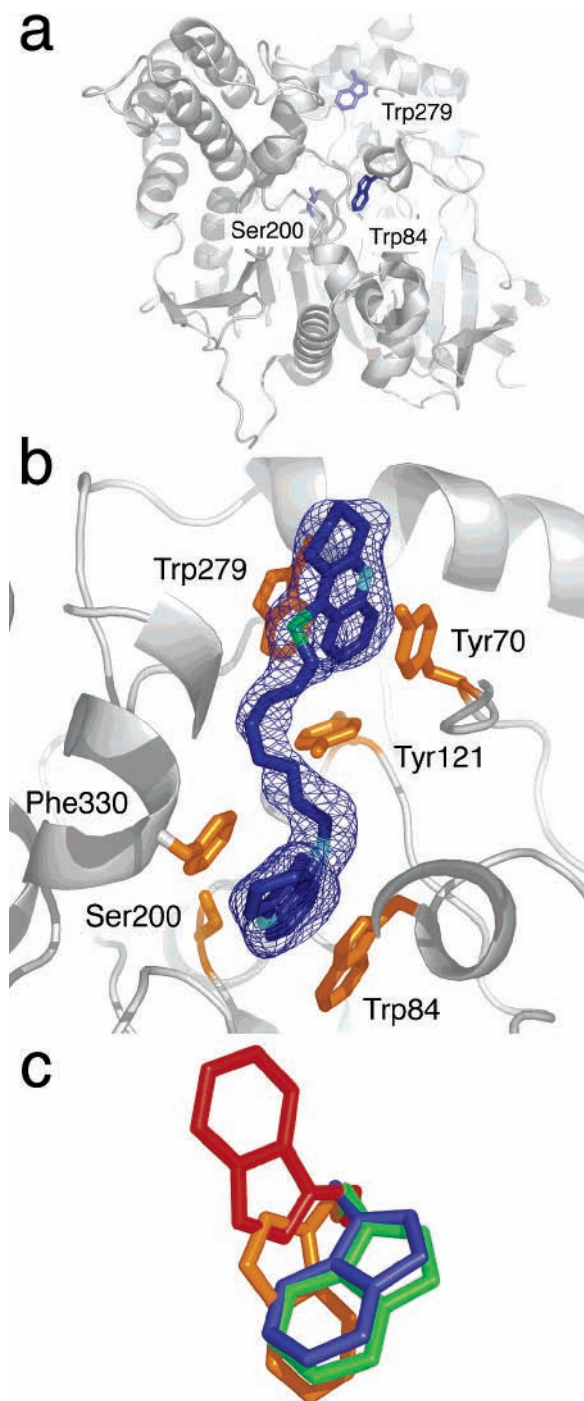


Figure 2. (a) 3D structure of native *TcAChE* (PDB access code 1EA5), highlighting the catalytic Ser200 and Trp84 in the active and Trp279 at the peripheral substrate binding site. (b) The bifunctional inhibitor NF595 (S: green, N: light-blue, C: dark-blue) spans the gorge of *TcAChE*. Its orientation was identified with the help of the strongly diffracting sulfur atom. Phe330 is present in two alternate conformations. Only the one close to NF595 is shown. The simulated-annealing omit map is contoured at 4.5 σ . (c) Conformational plasticity in the peripheral-site tryptophan (Trp279 of *TcAChE* in the native (blue) and the NF595-bound (orange) structure and Trp286⁶ of mAChE in the native (green) and an inhibitor-bound (red) structure. The χ values for the peripheral-site Trp side chains are: $\chi_1 = -61^\circ$, $\chi_2 = 92^\circ$ (Trp279 native), $\chi_1 = -116^\circ$, $\chi_2 = -132^\circ$ (Trp279 NF595), $\chi_1 = -60^\circ$, $\chi_2 = 90^\circ$ (Trp286 native) and $\chi_1 = -162^\circ$, $\chi_2 = 52^\circ$ (Trp286 *synI* TZ2PA6). Panels a–c show the enzyme in very similar, yet not exactly identical orientations.

The AChE peripheral site has been shown to promote the growth and maturation of β -amyloid plates,⁸ a process that is thought to

be at the origin of neurodegeneration associated with Alzheimer disease. The observed mobility of the peripheral site should be of importance in the elaboration of models that aim at addressing the structural interaction between AChE and β -amyloid structures.

The observation of conformational flexibilities of the peripheral-site tryptophan, Phe330,⁹ the catalytic His440,¹⁰ and parts of the enzyme's wall near the acyl-binding pocket¹¹ draws a dynamic picture of the gorge and the active site in *TcAChE*. Indeed, a delicate balance between rigidity and flexibility might resolve the apparent paradox between AChE catalytic efficiency and the reduced accessibility of its active site.

We suggest that the NF595 inhibitor selects a minor, yet already existing conformation of the complex energy landscape of the native enzyme. Indeed, experimental¹² and computational¹³ evidence indicates that motions required for ligand binding or catalysis are already existing in the equilibrium dynamics of the native state of enzymes. Whether this holds true for Trp279 could be addressed by molecular dynamics simulations. The observed plasticity of functionally relevant structural elements is of importance for structure-based drug-design. Indeed, in the quest for tailor-made drugs, an enzyme should not be considered only as a rigid template, but conformational heterogeneity should be taken into account as well.¹¹ In this context, X-ray crystallography is a powerful tool that can address both structural and dynamical aspects of biological macromolecules.

Acknowledgment. We are grateful to Lilly Toker, Joel Sussman, and Israel Silman for providing us with purified *TcAChE* and for a fruitful long-term collaboration, and to Martin Blackledge and Giuseppe Zaccai for critically reading the manuscript. We thank the ESRF staff for help during data collection. Financial support by the CEA to J.P.C. and M.W. is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available: A movie, showing structural changes in the gorge upon binding of NF595, and X-ray data processing and structure refinement statistics. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Frauenfelder, H.; Sligar, S. G.; Wolynes, P. G. *Science* **1991**, *254*, 1598–1603.
- (2) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- (3) Shen, T.; Tai, K.; Henchman, R. H.; McCammon, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 332–340.
- (4) Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1–4.
- (5) Silman, I.; Sussman, J. L. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 293–302.
- (6) Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 1449–1454.
- (7) Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A.; Greenblatt, H. M.; Harel, M.; Raves, M. L.; Segall, Y.; Barak, D.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7032–7039.
- (8) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Perez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron* **1996**, *16*, 881–891.
- (9) Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Structure* **1999**, *7*, 297–307.
- (10) Millard, C. B.; Koellner, G.; Ordentlich, A.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9883–9884.
- (11) Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guenard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15405–15411.
- (12) Eisenmesser, E. Z.; Millet, O.; Labeikovsky, W.; Korzhnev, D. M.; Wolf-Watz, M.; Bosco, D. A.; Skalicky, J. J.; Kay, L. E.; Kern, D. *Nature* **2005**, *438*, 117–121.
- (13) Tobi, D.; Bahar, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 18908–18913.

JA058683B

Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase

Jacques-Philippe Colletier¹, Didier Fournier², Harry M Greenblatt³, Jure Stojan⁴, Joel L Sussman³, Giuseppe Zaccai^{1,6}, Israel Silman⁵ and Martin Weik^{1,*}

¹Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS/UJF), Grenoble Cedex, France, ²Groupe de Biotechnologie des Protéines, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (CNRS/UPS), Toulouse, France, ³Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, ⁴Medical Faculty, Institute of Biochemistry, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, ⁵Department of Neurobiology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel and ⁶Institut Laue-Langevin, Grenoble Cedex, France

Acetylcholinesterase (AChE) terminates nerve-impulse transmission at cholinergic synapses by rapid hydrolysis of the neurotransmitter, acetylcholine. Substrate traffic in AChE involves at least two binding sites, the catalytic and peripheral anionic sites, which have been suggested to be allosterically related and involved in substrate inhibition. Here, we present the crystal structures of *Torpedo californica* AChE complexed with the substrate acetylthiocholine, the product thiocholine and a nonhydrolysable substrate analogue. These structures provide a series of static snapshots of the substrate *en route* to the active site and identify, for the first time, binding of substrate and product at both the peripheral and active sites. Furthermore, they provide structural insight into substrate inhibition in AChE at two different substrate concentrations. Our structural data indicate that substrate inhibition at moderate substrate concentration is due to choline exit being hindered by a substrate molecule bound at the peripheral site. At the higher concentration, substrate inhibition arises from prevention of exit of acetate due to binding of two substrate molecules within the active-site gorge.

The EMBO Journal (2006) **25**, 2746–2756. doi:10.1038/sj.emboj.7601175; Published online 8 June 2006

Subject Categories: structural biology

Keywords: acetylcholinesterase; enzyme catalysis; kinetic crystallography; substrate inhibition; substrate traffic

Introduction

The principal role of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is termination of impulse transmission at cholinergic synapses by rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh; Rosenberry, 1975). In a first step, the enzyme is acetylated and the choline product expelled. A water mole-

cule then regenerates the free enzyme with concomitant release of acetic acid. As required by its biological function, AChE is a very efficient enzyme, with a turnover of 10^3 – 10^4 s⁻¹, operating at a speed near the diffusion limit (reviewed by Quinn, 1987; Silman and Sussman, 2005). AChE is the target of nerve agents (Millard *et al*, 1999), anti-Alzheimer drugs (reviewed by Greenblatt *et al*, 2003), and insecticides (Smitsaert, 1964), and indeed has been incorporated into biosensors for both insecticides and nerve agents (Marty *et al*, 1992). An understanding of its mode of action thus goes beyond academic interest.

Solution of the crystal structure of *Torpedo californica* (Tc) AChE (Sussman *et al*, 1991) revealed, unexpectedly, that its active site is buried at the bottom of a narrow gorge, about 20 Å deep, lined with conserved aromatic residues (Figure 1). This raised cogent questions as to how traffic of substrates and products, to and from the active site, can occur so rapidly. The active-site gorge is only ~5 Å wide at a bottleneck formed by the van der Waals surfaces of Tyr121 and Phe330 (residue numbers refer to the TcAChE sequence throughout the manuscript unless stated otherwise). As the diameter of the quaternary moiety of choline is 6.4 Å, substantial breathing motions of gorge residues are required for traffic of substrates and products to occur.

Rather than displaying Michaelis–Menten kinetics, AChE is inhibited at high substrate concentrations (Alles and Hawes, 1940; Marcel *et al*, 1998; Johnson *et al*, 2003). Like butyrylcholinesterase (BChE) (Eriksson and Augustinsson, 1979; Masson *et al*, 1996), a structurally homologous enzyme (Nicolet *et al*, 2003), certain AChE species can be activated at low substrate concentrations (Marcel *et al*, 1998; Brochier *et al*, 2001). All current kinetic models for AChE propose the existence of at least two substrate-binding sites, the active site, near the bottom of the active-site gorge, and the peripheral anionic site (PAS), near its entrance. Binding of ligands at the PAS affects catalytic activity (Bergmann *et al*, 1950; Changeux, 1966; Belleau *et al*, 1970; Roufogalis and Quist, 1972; Taylor and Lappi, 1975).

The active site is composed of two subsites. In the catalytic anionic subsite (CAS), it has been proposed that the choline moiety of ACh is stabilized principally via a cation– π interaction with Trp84, and also interacts with Glu199 and Phe330 (Sussman *et al*, 1991). A similar cation– π interaction occurs in human BChE (HuBChE), where Trp82 interacts with the product choline and the substrate butyrylthiocholine (Nicolet *et al*, 2003). The esteratic subsite in TcAChE contains a typical serine-hydrolase catalytic triad, Ser200–His440–Glu327. A substantial contribution to ACh binding within the active site also arises from stabilization of the carbonyl oxygen within the oxyanion hole, Gly118, Gly119 and Ala201, and of the acetyl group in the ‘acyl-pocket’, Trp233, Phe288, Phe290 and Phe331 (Harel *et al*, 1996).

The PAS contains three principal amino acids, Trp279, Tyr70 and Asp72. This was established by site-directed mutagenesis and by binding of inhibitors such as propidium,

*Corresponding author. Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS/UJF), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 95 69; Fax: +33 4 38 78 54 94; E-mail: weik@ibs.fr

Received: 7 November 2005; accepted: 8 May 2006; published online: 8 June 2006

BW284C51, *d*-tubocurarine and the mamba venom toxin, fasciculin (Radic *et al*, 1991, 1994; Barak *et al*, 1994; Eichler *et al*, 1994), as well as by solution of the 3D structures of complexes with decamethonium (Harel *et al*, 1993), fasciculin (Bourne *et al*, 1995; Harel *et al*, 1995), BW284C51 (Felder *et al*, 2002) and, most recently, of complexes of three low-molecular-weight PAS inhibitors with mouse AChE (Bourne *et al*, 2003). The fact that, at high concentrations, ACh affects the binding of PAS inhibitors suggests that the site at which they bind is equivalent to, or overlaps with, the PAS for ACh (Radic *et al*, 1991, 1997; Barak *et al*, 1994; Eichler *et al*, 1994; Eastman *et al*, 1995; Rosenberry *et al*, 1999). It has also been proposed that the PAS plays a role in substrate inhibition (Radic *et al*, 1991; Shafferman *et al*, 1992; Eichler *et al*, 1994; Rosenberry *et al*, 1999; Johnson *et al*, 2003), by a mechanism in which binding of ACh at the PAS hampers choline exit from the active site (Shafferman *et al*, 1992; Rosenberry *et al*, 1999; Johnson *et al*, 2003; Stojan *et al*, 2004).

It was suggested earlier that substrate inhibition involves retardation of deacetylation owing to binding of ACh to the acetylated enzyme (Krupka and Laidler, 1961). A combination of these models led to the proposal of a more sophisticated mechanism for substrate inhibition, which involves binding of two ACh molecules in the gorge of the acetylated enzyme, thereby obstructing access of water, and thus hindering deacetylation (Stojan *et al*, 2004). The molecular basis for substrate inhibition of AChE, however, remains controversial.

Despite the extensive kinetic and structural studies outlined above, no direct structural evidence has been presented for the mode of binding of a substrate to AChE. In the following, we describe the crystal structures of four catalytically relevant complexes of *TcAChE*: one with a non-hydrolysable substrate analogue, 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium (OTMA), two with the enzymatic substrate acetylthiocholine (ATCh) soaked into the crystal at two different concentrations and one with the product thiocholine

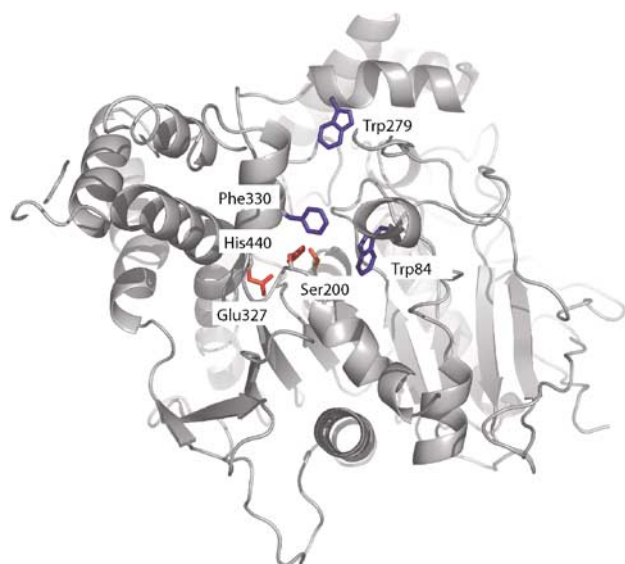


Figure 1 3D structure of native *TcAChE* (pdb access code 1EA5), highlighting the catalytic triad in red, Trp84 in the CAS, Trp279 at the PAS, and the bottleneck residue Phe330 in blue.

(TCh), solved at 2.6, 2.3, 2.15 and 1.95 Å resolution, respectively. Our results provide direct structural insight into the *TcAChE* catalytic pathway, through a series of 'snapshots' of this enzyme in action. Furthermore, they present a structural view of the mechanism(s) resulting in substrate inhibition.

Results

Kinetics of ATCh hydrolysis by *TcAChE*

The rate of hydrolysis of ATCh by *TcAChE* was measured as a function of ATCh concentration (Figure 2). Enzymatic activity follows an apparent Michaelian behaviour up to 0.5 mM ATCh, above which concentration substrate inhibition is observed, and the specific activity gradually decreases to zero. The data were fitted by multiple nonlinear regressions using a model that assumes two substrate-inhibition mechanisms (for details, see Stojan *et al*, 2004). The transition between the two mechanisms was calculated to be at 100 mM, where both substrate-inhibited species are populated to a similar extent (see Supplementary data for more details). Substrate concentrations below (20 mM) and above (500 mM) this transition were chosen for the crystal soaks, in order to preferentially accumulate either one or the other of the two substrate-inhibited species. In order to address the influence of changes in ionic strength, we repeated the activity measurements in the presence of 270 mM and 1 M NaCl (i.e. at ionic strengths that exceed the maximum ionic strength in Figure 2; data not shown). The activity curves with NaCl are shifted to higher substrate concentrations, yet the shape of the activity curves, with and without NaCl, is virtually identical, with a deviation from a single substrate inhibition mechanism being visible in all cases.

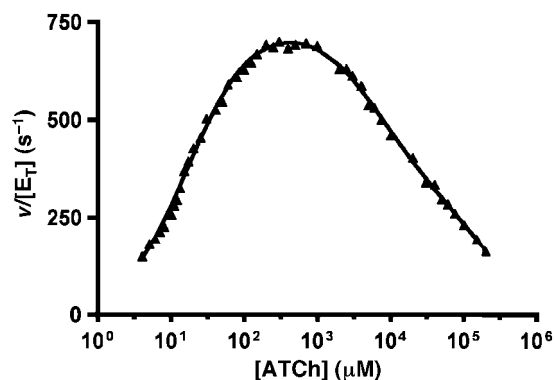


Figure 2 pS curve for ATCh hydrolysis by *TcAChE*. The rate of hydrolysis (triangles) is shown as a function of ATCh concentration. The data were fitted (plain line; global correlation coefficient of 0.9984) by using an equation based on a model accounting for two different substrate inhibition phenomena (Stojan *et al*, 2004). The following set of kinetic parameters describes the data: acetylation rate: $k_2 = 65300 \text{ s}^{-1}$; deacetylation rate: $k_3 = 872 \text{ s}^{-1}$; substrate affinity for the PAS: $K_p = 136 \mu\text{M}$; ratio of substrate molecules at the PAS sliding to the CAS of the free enzyme: $1/K_L = 0.089$; ratio of substrate molecules at the PAS sliding to the CAS of the acetylenzyme: $1/K_{LL} = 0.0016$; coefficient for activation of deacetylation due to the PAS being occupied by a substrate molecule: $a = 1$; coefficient for inhibition of choline exit due to the PAS being occupied by a substrate molecule: $b = 0.008$. The transition between the two-substrate inhibition mechanisms was calculated to occur at around 100 mM (see Supplementary data for details).

Structure of the OTMA/TcAChE complex (2.6 Å)

OTMA differs from ACh only in the replacement of the ester oxygen by a carbon (Figure 3). In the OTMA/TcAChE complex, two OTMA molecules are seen, one within the active site and one at the PAS (Figure 4A). Binding of OTMA in the active site produces minor shifts (<0.5 Å) in Ser200 and His440, hydrogen bonding within the catalytic triad being conserved. OTMA is positioned between Ser200 and Trp84 (Figure 4A and B). Its quaternary group makes cation- π interactions with Trp84 and Phe330, with distances between the two closest carbon atoms of 3.6 and 5.5 Å, respectively. Further stabilization of the quaternary moiety can be ascribed to electrostatic interaction with the acidic side chain of Glu199 (distance between Glu199O ϵ 2 and the quaternary nitrogen: 4.2 Å). The carbonyl oxygen hydrogen bonds to Gly118N, Gly119N and Ala201N in the oxyanion hole (distances: 2.9, 2.5 and 2.7 Å, respectively). The position of the carbonyl carbon of the substrate analogue relative to Ser200O γ is modelled at a covalent-bonding distance of 1.4 Å (Figure 4B). An attempt to model a nonbonded interaction (2.6 Å) produced a strong discrepancy with the experimental electron density (cf. Materials and methods).

At the PAS, a second OTMA molecule is seen, with its CH₃CO moiety pointing towards the active site (Figure 4C). Its quaternary group makes cation- π interactions with the aromatic rings of Trp279 and Tyr70 (distances between the closest carbon atoms of 3.1 and 3.4 Å, respectively), and its carbonyl oxygen is weakly H-bonded to Tyr121O ζ (3.3 Å).

The most prominent conformational change observed in the enzyme molecule is a movement of the aromatic rings of Phe330 and Phe331 towards the active site (Figure 5A). As a consequence, the bottleneck in the gorge becomes even narrower than in the native structure (Figure 5B), the distance between the van der Waals surfaces of Phe330 and Tyr121 decreasing from ~ 5 to ~ 3 Å (Figure 5). The conformational change results in a cation- π interaction between Phe330 and the TMA group, which enhances stabilization of the OTMA molecule bound at the active site.

Structure of the TCh/TcAChE complex (1.95 Å)

Two TCh molecules are seen in the active-site gorge (Figure 6). The catalytic serine is not acetylated but displays two alternate conformations. At the CAS, the quaternary

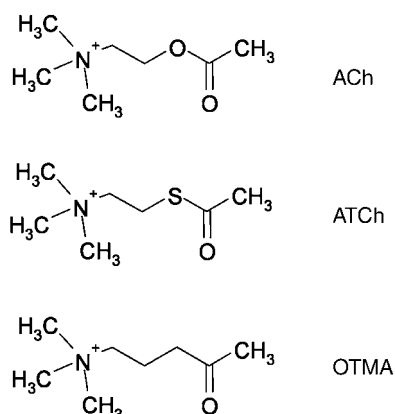


Figure 3 Structures of ACh, ATCh and 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium (OTMA) iodide.

moiety of the TCh molecule points towards the entrance of the gorge, making strong cation- π interactions with both Trp84 and Phe330 (distances between the two closest carbon atoms: 3.3 and 3.8 Å, respectively). The same rotation of the Phe330 side chain towards the active site described above for the OTMA/TcAChE complex is observed for the TCh/TcAChE complex, and again results in a strong cation- π interaction with the TMA moiety of the bound ligand. The thiol group is stabilized by a weak hydrogen bond (3.2 Å) with Glu199O ϵ 1. At the PAS, the TCh molecule is stabilized principally by a cation- π interaction between its TMA moiety and Trp279 (distance between the two closest carbon atoms: 3.2 Å). The thiol group points towards the active site, but no clear interaction with any active-site gorge residue is seen. The

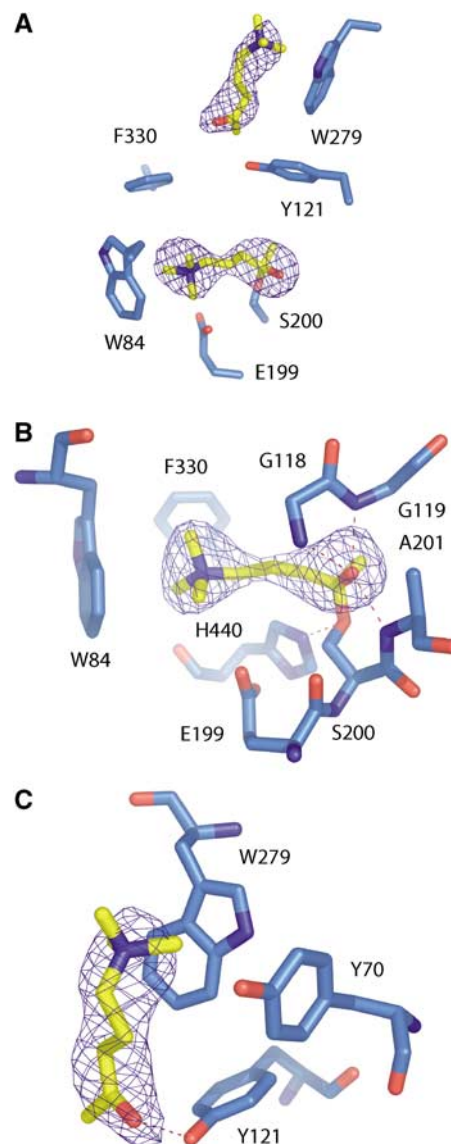


Figure 4 Binding of substrate analogue molecules in the OTMA/TcAChE complex. (A) Overview of the binding sites; (B) binding of OTMA in the CAS; (C) binding of OTMA at the PAS. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxyanion-hole residues (Gly118, Gly119, Ala201) and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440) are shown in (B). The PAS residues (Tyr70, Tyr121 and Trp279) are shown in (C). The $F_o - F_c$ electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of OTMA, is superimposed on the model.

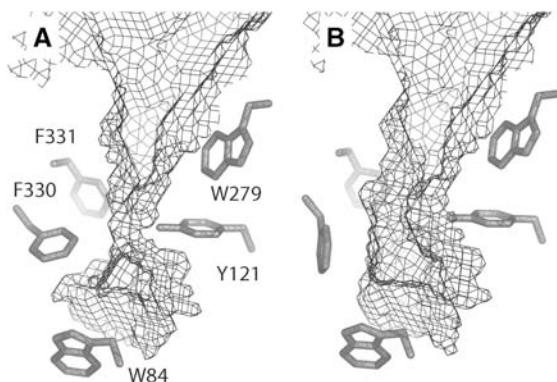


Figure 5 Rotation of Phe330 and active-site gorge accessibility in (A) OTMA/TcAChE; (B) native TcAChE. The water-accessible surfaces were calculated using VOIDOO (Kleywegt, 1994), employing a 1.4 Å probe radius, and taking only protein atoms into account.

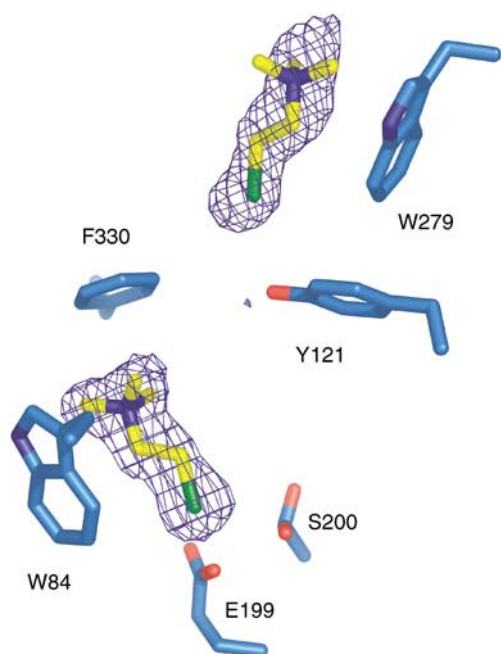


Figure 6 Binding of TCh molecules in the TCh/TcAChE complex. The F_o-F_c electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the TCh molecules, is superimposed on the model. The catalytic serine (Ser200) displays two alternate conformations.

same structural result, that is, binding of TCh molecules at both the PAS and the CAS, is obtained when crystals are soaked in 2 mM ATCh (data not shown), owing to the rapid hydrolysis of ATCh to TCh at this concentration.

Structure of the ATCh/TcAChE complex obtained at 20 mM ATCh (2.3 Å)

In this complex, the catalytic serine is acetylated, an ATCh molecule can be assigned at the PAS, and a TCh molecule at the CAS (Figure 7A). An electron density peak in the initial F_o-F_c map, 1.4 Å from Ser200O γ , is attributed to a covalently bound acetyl group with an occupancy of 0.7 (Figure 7B). Its carbonyl oxygen points towards the center of the active site, and is hydrogen-bonded to two out of the three constituents

of the oxyanion hole (distances of 3.0 and 2.9 Å from Gly118N and Gly119N, respectively). Its methyl group is oriented towards the acyl pocket. Native TcAChE crystals obtained from the same enzyme batch did not display any electron density adjacent to Ser200 (not shown). Consequently, and as enzymatic activity within the crystal has been demonstrated (Nicolas *et al*, 2001), we conclude that Ser200 had been acetylated by the ATCh in the soaking solution.

The electron density peak within the CAS can be modelled as a TCh molecule (Figure 7A and B) that binds in the same position and orientation as TCh in the TCh/TcAChE complex (Figure 6). Its TMA group makes a cation- π interaction with the aromatic rings of Trp84 and Phe330 (distances between the two closest carbon atoms of 3.6 and 3.7 Å, respectively). The thiol group is 3.3 Å from Glu199O ϵ 1. The same rotation of the Phe330 side chain described for the OTMA/TcAChE and TCh/TcAChE complexes is seen, again resulting in a strong cation- π interaction between its phenyl ring and the TMA moiety of the TCh molecule. Thus, in this complex, as in those described above, the gorge is in a closed configuration.

At the PAS, the observed electron density is attributed to an ATCh molecule (Figure 7A) that binds in the same orientation (acetyl group pointing down the gorge towards the active site), and at a similar position, as the substrate analogue in the OTMA/TcAChE complex (Figure 4A and C). Its carbonyl oxygen is hydrogen-bonded to Tyr121O ζ (distance 3.0 Å). The TMA moiety of ATCh makes cation- π interactions with the aromatic rings of Trp279 and Tyr70 (distances between the closest carbon atoms of 3.2 and 3.6 Å, respectively).

Structure of the ATCh/TcAChE complex obtained at 500 mM ATCh (2.15 Å)

In this structure, Ser200 is acetylated, and an intact ATCh molecule is assigned at both the active site and the PAS (Figure 7C). The positive-density peak near Ser200 in the initial F_o-F_c map could not be modelled as a single, covalently linked acetyl group as in the ATCh/TcAChE crystal structure obtained at 20 mM ATCh. Instead, two alternate conformations were modelled, one for an acetyl group covalently linked to Ser200, and one for a free acetate group (50% occupancy for each; Figure 7D). In both conformations, the methyl group points towards the acyl pocket, and the carbonyl oxygen towards the oxyanion hole (distances: 3.1 and 2.8, 3.1 and 2.5, and 2.8 and 3.2 Å from Gly118N, Gly119N and Ala201N, respectively, for the acetyl and the acetate moieties). The other oxygen of the acetate is hydrogen-bonded to His440N ϵ 2 (distance: 2.8 Å).

The most prominent positive-density peak in the initial F_o-F_c map, at the bottom of the active-site gorge, between Trp84, Glu199 and Phe330, could not be modelled by a TCh molecule as in the ATCh/TcAChE complex obtained at 20 mM ATCh. The density is best modelled by an ATCh molecule (Figure 7D). Its TMA moiety points towards the bottom of the gorge, electrostatically stabilized by the Glu199 side chain (distance between Glu199O ϵ 1 and the quaternary nitrogen: 3.3 Å), and is in cation- π interaction with Trp84 (distance between the two closest carbon atoms: 3.1 Å). One of the three methyl groups is 2.8 Å from Glu199O ϵ 1. Such a relatively short distance is also sometimes observed in crystals of small organic molecules. Thus, a 2.5–2.9 Å distance between

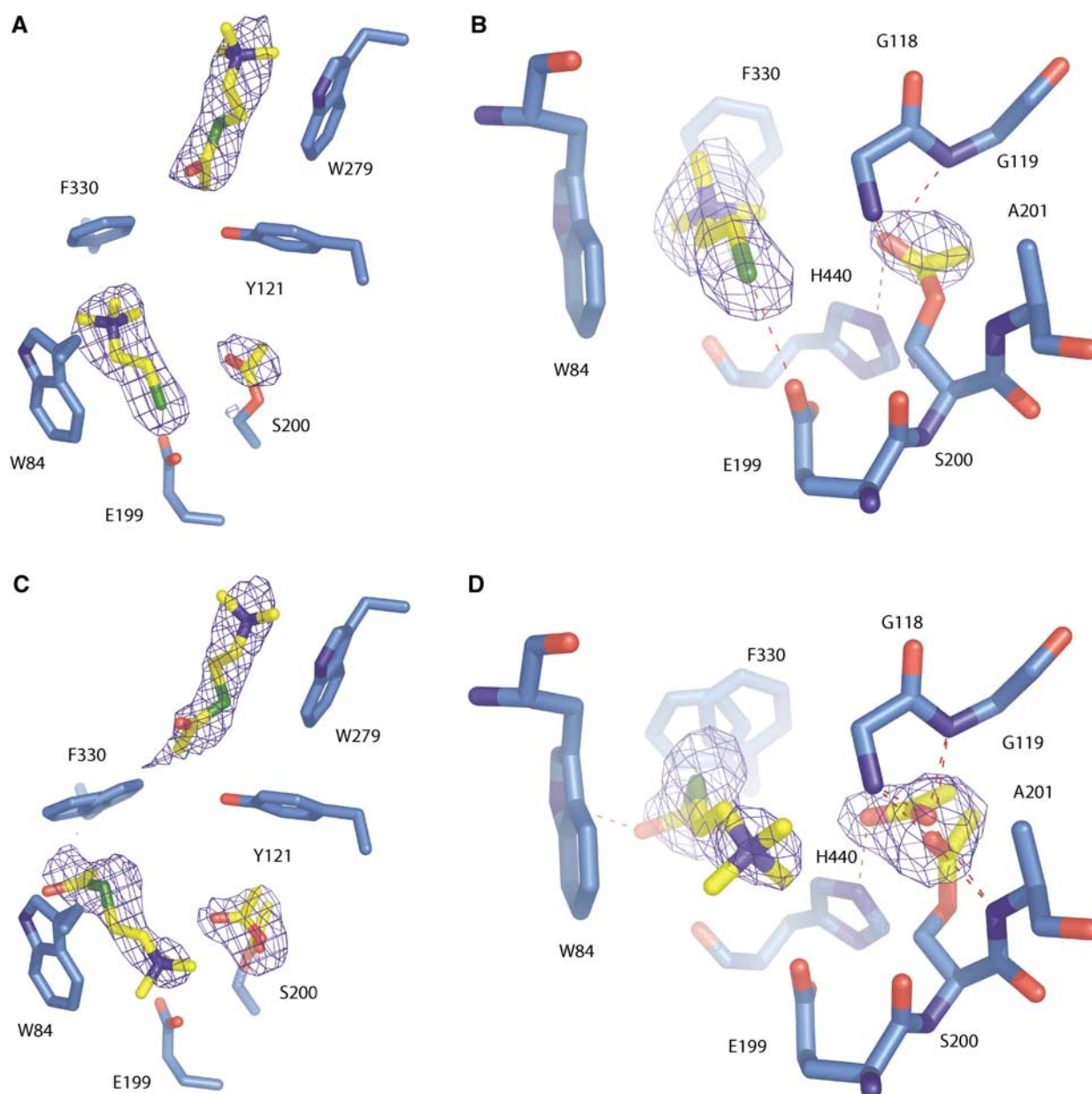


Figure 7 Substrate and product binding sites in substrate-inhibited *TcAChE* at 20 mM ATCh (A, B) and at 500 mM ATCh (C, D). (A) Overview of the binding sites; (B) acetylation of the catalytic serine and binding of TCh in the active site. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxyanion hole residues (Gly118, Gly119 and Ala201) and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440) are shown. The $F_o - F_c$ electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the ATCh and TCh molecules and of the acetyl group linked to Ser200, is superimposed on the model. (C) Overview of the binding sites; (D) acetylation of the catalytic serine and binding of ATCh in the active site. The CAS residues (Trp84, Glu199 and Phe330), the oxyanion hole residues (Gly118, Gly119 and Ala201) and the catalytic serine (Ser200) and histidine (His440) are shown. The $F_o - F_c$ electron density map (contour level 4σ), computed without the atomic coordinates of the ATCh molecules and of the acetyl and acetate groups, is superimposed on the model.

a carbonyl oxygen and a methyl group was detected in 82 entries (with an *R* factor $<5\%$) in the Cambridge Small Molecule Data Base. The CH_3CO group also makes a carbonyl–carbonyl interaction (Allen *et al*, 1998; Deane *et al*, 1999) with the main-chain carbonyl of His440. A sulphur– π interaction (Bourne *et al*, 1995; Harel *et al*, 1995) with the Phe330 side chain in one of the two alternate conformations (distance between the two closest non-hydrogen atoms: 3.7 Å) might also contribute to stabilization.

At the PAS, the density can be attributed to an ATCh molecule (Figure 7C) that binds in the same orientation

(CH_3CO group pointing towards the active site), and at a similar position, as the substrate analogue in the OTMA/*TcAChE* complex (Figure 4C) and as the ATCh molecule in the ATCh/*TcAChE* complex obtained at 20 mM ATCh (Figure 7A).

The side chain of Phe330 appears to adopt two alternate conformations that both result in a closed configuration of the gorge. Each of them is stabilized by a hydrophobic interaction with the methyl moiety of the CH_3CO group of the ATCh molecule either at the CAS or at the PAS (distances between the two closest non-hydrogen atoms of 3.2 and 2.8 Å, respectively).

Discussion

The focus of this study was on identification of substrate and product-binding sites in *TcAChE* that may shed light on intramolecular substrate, product and solvent traffic during catalysis. Owing to the high turnover number of *AChE* (Rosenberry, 1975; Quinn, 1987), it has not been possible to obtain a crystal structure for the functional enzyme–substrate complex, *viz* that which forms at low substrate concentrations. We overcame this problem by adopting two approaches. One was to solve the structure of a complex with *TcAChE* of a nonhydrolysable substrate analogue, OTMA. The other was to solve the structure of ATCh/*TcAChE* complexes for which the substrate had been soaked into the crystal at such high concentrations that the enzyme was inhibited by excess of its own substrate. The latter structures provide a molecular description of substrate inhibition in *AChE*. The structure of a TCh/*TcAChE* complex revealed binding sites for the enzymatic product, choline. Taken together, these structures permit a detailed structural description of substrate traffic during *TcAChE* catalysis (Figure 8), which can be correlated with kinetic data for *TcAChE* and for other *AChEs*.

Nonhydrolysable substrate-analogue binding and structural changes

The substrate-analogue OTMA (Thanei-Wyss and Waser, 1989) mimics the natural substrate, ACh, except that the ester oxygen is replaced by a carbon (Figure 3). Consequently, OTMA cannot be hydrolysed by *AChE*, and acts as a competitive inhibitor with a similar affinity as the substrate (Stojan *et al*, 2004). The structure of the OTMA/*TcAChE* complex reveals two binding sites, at the active site and at the PAS (Figure 8B). The position of OTMA in the active site is very similar to that suggested for ACh by molecular modelling (Sussman *et al*, 1991), and from inspection of the structure of a complex of *TcAChE* with the potent transition-state analogue, *m*-(*N,N,N*-trimethylammonio)-2,2,2-trifluoroacetophenone (TMTFA, Harel *et al*, 1996). The quaternary nitrogen atom of OTMA makes a cation- π interaction with Trp84, and the CH_3CO moiety is covalently linked to Ser200 γ . Thus, the OTMA molecule binds in the active site just as a substrate molecule would be expected to bind before catalysis. This structure represents the hemiketal equivalent of the tetrahedral intermediate that forms sub-

sequent to productive substrate binding (Michaelis–Menten complex).

At the PAS, an OTMA molecule is seen, with its CH_3CO moiety oriented towards the active site, and its quaternary nitrogen in cation- π interaction with Trp279. Its detection is in agreement with the predictions of kinetic and structural studies suggesting that the peripheral site serves as a functional substrate-binding site (Radic *et al*, 1991; Barak *et al*, 1994; Eichler *et al*, 1994; Bourne *et al*, 1995, 2003; Harel *et al*, 1995).

In the OTMA/*TcAChE* complex, the side chain of Phe330 rotates towards the active site. Consequently, the OTMA molecule in the CAS is further stabilized by cation- π interaction with the phenyl ring of Phe330. This residue, together with Tyr121, forms a bottleneck in the gorge of native *TcAChE*, restricting substrate access to the active site. The observed rotation further decreases access to the active site, and obviously reduces the catalytic volume (Figures 5 and 8B). The increased confinement may contribute to the high catalytic efficiency for two reasons. First, the probability of substrate hydrolysis is increased with reduction of the reaction volume; secondly, the activation barrier for the formation and decay of the tetrahedral intermediate may be decreased owing to substrate desolvation (Bohme and Mackay, 1981; Madura and Jorgensen, 1986; Harel *et al*, 1996). The TCh/*TcAChE* structure (Figure 8C), together with the 20 mM ATCh/*TcAChE* structure (Figure 8D), demonstrate that the closing of the gorge, mediated by Phe330 side chain rotation towards the active site, is related to the binding of a TMA moiety in the CAS, rather than to the binding of a substrate molecule at the PAS. Indeed, whatever moiety is present at the PAS, a closed conformation of the gorge is always observed when an ATCh or a TCh molecule is present at the active site. An identical rotation of Phe330 is observed in the complex structure of *TcAChE* with TMTFA (Harel *et al*, 1996). If expulsion of the choline product by the enzyme occurs along the gorge axis, it will require expenditure of energy, as Phe330 will have to rotate back to its original position for the gorge to assume its open state.

Substrate inhibition in *AChE*

TcAChE, like other *AChEs*, is inhibited by high concentrations both of its natural substrate, ACh, and of its close analogue, ATCh (Ellman *et al*, 1961). It was, therefore, anticipated that

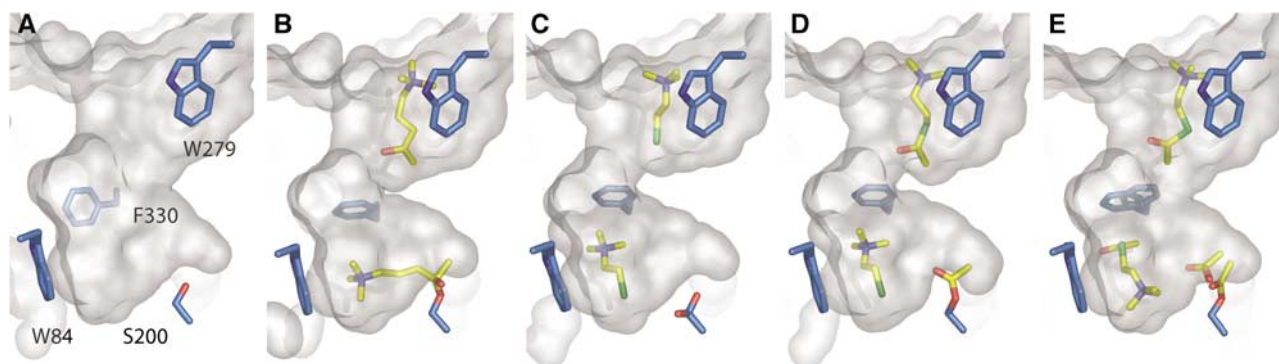


Figure 8 Molecular surfaces of the active-site gorge in native *TcAChE* (A), and in the OTMA/*TcAChE* (B), 20 mM TCh/*TcAChE* (C), 20 mM ATCh/*TcAChE* (D) and 500 mM ATCh/*TcAChE* (E) complexes. OTMA, ATCh and TCh are shown as yellow sticks, as is the acetyl group on Ser200 in (D, E).

soaking the substrate into *TcAChE* crystals at a high concentration might both yield the structure of the substrate-inhibited enzyme, and allow identification of binding sites relevant to substrate traffic and inhibition. ATCh was preferred over ACh, because the higher scattering power of its sulphur atom, compared to the corresponding oxygen in ACh, facilitated identification of substrate molecules and assignment of their orientations. Moreover, this substrate displays kinetic properties virtually identical to those of ACh, and is employed in nearly all kinetic studies on AChE.

The substrate-inhibited structures obtained at the high and moderate substrate concentrations differed significantly. In the complex obtained at 20 mM ATCh, the catalytic serine (Ser200) is acetylated, a TCh molecule is seen at the CAS and an ATCh molecule at the PAS (Figure 8D). At 500 mM, Ser200 is acetylated with partial occupancy (~50%), a free acetate group (~50% occupancy) is found nearby and two ATCh molecules are seen, one at the active site and the other at the PAS (Figure 8E).

In order to facilitate correlation of the observed species with the kinetic data, it is useful to summarize the possible steps involved in substrate catalysis in the absence of inhibition:

- (1) The substrate enters the active site and binds to form a covalent complex with Ser200 (tetrahedral intermediate).
- (2) Collapse of tetrahedral intermediate, with choline as the leaving group. Ser200 is now acetylated and choline is still bound to the CAS.
- (3) Choline leaves the active site, and exits the enzyme via the gorge.
- (4) A water molecule attacks the carbon atom of the acyl group, and a new tetrahedral intermediate is formed.
- (5) The tetrahedral intermediate collapses, with Ser200 as the leaving group; acetate remains bound in the active site.
- (6) Acetate leaves the active site and exits the enzyme via the gorge.

The different structures seen at 20 and 500 mM ATCh are consistent with kinetic data that propose two concentration-dependent modes of substrate inhibition (Stojan *et al*, 2004). At moderate degrees of substrate inhibition, as steps 1 and 2 above are ongoing, a substrate molecule can bind at the PAS at the top of the gorge. This prevents step 3, choline exit, from proceeding rapidly, and causes a buildup of the species seen in the crystal structure (Figure 8D): Ser200 is acetylated, TCh is bound at the CAS, and a substrate molecule occupies the PAS. As binding of substrate at the PAS is reversible, windows of opportunity exist for TCh to escape from the gorge. Once TCh has left the CAS, water can attack the acetylated enzyme, and acetate can escape before a new substrate molecule enters the gorge. This model allows both for slow turnover and for increased occupancy of the CAS by TCh, as predicted by several kinetic models (Shafferman *et al*, 1992; Szegletes *et al*, 1998; Rosenberry *et al*, 1999; Johnson *et al*, 2003; Stojan *et al*, 2004). Inhibition in this case is caused by retardation of TCh clearance from both the active site and the gorge.

At high substrate concentration, TCh can still escape in the now rare eventuality that the PAS is free, and water can gain access to Ser200. In this case, however, the gorge is rapidly saturated by substrate molecules before acetate can even leave the acyl-binding pocket. Although a substrate molecule

can bind at the CAS, its CH₃CO group cannot enter the acyl-binding pocket because the acetate has never cleared the active site. Instead, the CH₃CO group is forced to bind in a groove close to Phe330 and His440, which explains the different orientations of ATCh and TCh in the active site. The acetyl group at Ser200 remains in equilibrium between the acyl form and the free acetate molecule (see Wilson, 1951), as observed in the crystal structure (Figure 8E). Inhibition, in this case, is caused by prevention of acetate escape from the active site as a result of binding of two substrate molecules (Krupka and Laidler, 1961; Stojan *et al*, 2004).

The interaction with Glu199 of ATCh at 500 mM (electrostatic interaction with the TMA group; Figure 7D) provides an explanation for abolition of substrate inhibition in the *TcAChE* Glu199Asp (Gibney *et al*, 1990; Radic *et al*, 1992) and the corresponding HuAChE Glu202Asp mutants (Shafferman *et al*, 1992). Indeed, the substrate may be drawn deeper into the mutant active site, thus permitting deacetylation of Ser200 and acetate clearance to occur despite the presence of a substrate molecule. Likewise, the interactions with Phe330 of the TCh molecule in the active site at 20 mM (a cation- π interaction involving the TMA group) and of the ATCh in the active site at 500 mM (a sulphur- π interaction) rationalize the displacement of the substrate inhibition curve reported when this residue is replaced by a nonaromatic one (Shafferman *et al*, 1992; Barak *et al*, 1994; Stojan *et al*, 2004).

It may be asked if the substrate concentrations used in this study are close to physiologically relevant values at the synapse. A recent study estimates the ACh content of the synaptic vesicle to be ~ 500 mM (Van der Kloot *et al*, 2002). It is thus plausible that passive diffusion, coupled with rapid pore opening (Stiles *et al*, 1996) would result in local ACh concentrations in the cleft far in excess of the concentration of ~10 mM at which significant substrate inhibition is observed (Figure 2). A delicate balance between substrate inhibition and the high catalytic efficiency of AChE might be crucial to ensuring, *in situ*, that a sufficient amount of ACh reaches the postsynaptic membrane before being hydrolysed.

Structural comparison and relevance for traffic of substrates and products

All but one of the ATCh and OTMA molecules identified in this study have a common orientation; their CH₃CO group points towards the active site (Figure 8). This is surprising in view of the strong electrostatic field that is aligned with the gorge axis (Ripoll *et al*, 1993; Felder *et al*, 1997), the orientation of which should favour the quaternary group of the choline moiety entering first. However, the energy gained by formation of the H-bond between Tyr121 and the CH₃CO group, as well as by the hydrophobic stabilization of the aliphatic part of the substrate within the aromatic gorge, may compensate for the unfavourable orientation with respect to the electrostatic field. In any case, as the CH₃CO group needs to approach the catalytic serine, the observed orientation allows the substrate to slide straight through the gorge without the necessity of reorienting before productive interaction at the active site. The strong electrostatic field may attract an ACh molecule towards the enzyme surface, whereas binding at the PAS may serve as a filter that orients the ACh molecule with its CH₃CO group towards the active site.

The only ligand in this study not oriented with its CH₃CO group pointing towards the active site is the ATCh molecule in the CAS at 500 mM substrate concentration (Figures 7C, D and 8E). It is of interest that this orientation is very similar to the one observed in the 3D structure of the complex of butyrylthiocholine with the 'aged' soman conjugate of HuBChE (PDB accession code 1POP, Nicolet *et al*, 2003). Phosphorylation of the catalytic serine in HuBChE and its acetylation in TcAChE both prevent productive substrate binding. Concerning the product, TCh, the same binding mode in the active site of TcAChE is observed whether it is generated enzymatically, *in situ* (Figures 7A, B and 8D), or soaked into the crystal (Figures 6 and 8C). In the case of HuBChE, a choline molecule binds in the active site (PDB accession code 1POI, Nicolet *et al*, 2003) in the same position as TCh in TcAChE, yet rotated by 180 degrees, that is, with its OH group pointing towards the gorge entrance. This is most probably due to the absence of an aromatic residue at position 330. Indeed, Phe330 orients TCh in the active site of TcAChE by cation- π interaction with the quaternary nitrogen group. It should also be noted that substrate and product bind at the peripheral site in TcAChE, whereas no such binding is observed in HuBChE, probably due to the absence of an aromatic residue at position 279.

The synergy of the structures presented provides a series of snapshots of substrate entry into and product exit from the active site in TcAChE (Figure 8). The substrate enters the gorge with its CH₃CO group pointing inwards, and binds at the PAS, being stabilized mainly by cation- π interactions with Trp279 and Tyr70, and by a hydrogen bond with Tyr121 (Figures 4C and 8B). Subsequently, it passes the Tyr121/Phe330 bottleneck. If Ser200 is free (i.e. not acetylated), the substrate can form first a Michaelis-Menten complex, and then the tetrahedral intermediate. The latter is seen in the OTMA/TcAChE complex (Figures 4B and 8B). The substrate probably maintains a cation- π interaction with Phe330 throughout its approach to Ser200, which may be responsible for the conformational change in Phe330 (Figure 5) that results in the increased confinement of the active site during the hydrolytic step of catalysis, as discussed above. After hydrolysis, the choline product is expelled, with Ser200 remaining acetylated. We have identified two TCh-binding sites within the gorge that may be on its exit trajectory, one at the CAS, and the other at the PAS (Figures 6 and 8C).

This study provides, for the first time, insight into substrate and product binding sites in an AChE molecule. Extensive structural data on AChEs from various species, including, in addition to *Torpedo* electric organ, mammalian (Kryger *et al*, 2000; Bourne *et al*, 2003) and invertebrate (Harel *et al*, 2000) sources, have shown that their overall fold and active site architecture are highly conserved. Furthermore, all AChEs examined have been shown to display substrate inhibition (Alles and Hawes, 1940; Rosenberry, 1975; Radic *et al*, 1991; Shafferman *et al*, 1992; Eichler *et al*, 1994; Marcel *et al*, 1998; Szegletes *et al*, 1998; Rosenberry *et al*, 1999; Johnson *et al*, 2003; Stojan *et al*, 2004). For these reasons, it is reasonable to suggest that the insight into substrate and product traffic presented here can be generalized to AChEs from other species.

Materials and methods

Materials

ATCh was purchased from Sigma (St Louis, MO) and TCh was obtained by its hydrolysis at pH 12. The nonhydrolysable substrate analogue, 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium (OTMA) iodide, was synthesized according to Thanei-Wyss and Waser (1989). The inhibition constants of choline and OTMA for TcAChE were determined to be 950 and 68 μ M, respectively (data not shown). The pS curves corresponding to TcAChE hydrolysis of ATCh in the presence of choline or OTMA were fitted according to the model described by Stojan *et al* (2004); hence, the inhibition constants correspond to the affinity constants for the PAS.

Kinetics of ATCh hydrolysis

Hydrolysis of ATCh iodide was measured spectrophotometrically at 412 nm by the Ellman method (Ellman *et al*, 1961), at 25°C, in 25 mM phosphate buffer, pH 7. Substrate concentrations were 4 μ M–200 mM, with a minimum of 10 repetitions per concentration value. Activity was followed for 1 min after addition of the enzyme to the mixture, and spontaneous hydrolysis of substrate was subtracted. The data were analysed by multiple nonlinear regressions, using the model and equation of Stojan *et al* (2004), and the program GOSA (www.bio-log.biz).

Crystallization of TcAChE and soaking procedure

TcAChE was purified as described (Sussman *et al*, 1988; Raves, 1998). Trigonal crystals (space group P3₁21) of native TcAChE were obtained at 4°C by the hanging-drop vapour diffusion method, employing polyethyleneglycol 200 (PEG200) as precipitant. The mother liquor was 32% PEG200/0.15 M morpholinoethylsulphonic acid (MES), pH 5.8–6.2, and a protein concentration of 11.5 mg/ml was used. TcAChE crystals were soaked at 4°C in mother liquor at pH 6.0, containing either 0.5 mM OTMA (24 h in 5 μ l soaking solution), 20 mM TCh (12 h in 5 μ l soaking solution), 500 mM ATCh (40 min in 1.5 ml soaking solution) or 20 mM ATCh (12 h in 200 μ l soaking solution). When 20 mM ATCh was employed, crystals were transferred every hour into a fresh 20 mM ATCh solution, the last transfer being 10 min prior to flash-cooling of the crystal.

Data collection

Owing to the cryoprotective capacity of PEG200, all crystals were directly mounted in a cryo-loop and flash-cooled in a nitrogen stream at 100 K. X-ray diffraction data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) on beamlines BM30A (CRG FIP), ID14-EH2 or ID29. Data sets were indexed, merged and scaled using XDS/XSCALE, and amplitude factors generated using XDSCONV (Kabsch, 1993). For details, see Table I.

Structure determination and refinement

The native structure of TcAChE (PDB entry code 1EA5), without water and sugar molecules, was used as the starting model for rigid body refinement of all four data sets in the resolution range of 20–4 Å. Subsequently, all data sets underwent simulated annealing to 7500 K, with cooling steps of 10 K, followed by 250 steps of conjugate-gradient minimization. Diffraction data from 20 Å to the highest resolution limits were used for refinement, and maps were calculated using all data between 15 Å and the highest resolution limits. Graphic operations, modelling and model building were performed either with TURBO-FRODO (Roussel and Cambillau, 1989) or COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Energy minimization and individual B-factor refinement followed each stage of manual rebuilding. Refinement and map calculation were performed using either CNS version 1.1 (Brünger *et al*, 1998) or the REFMAC (Murshudov *et al*, 1997) and FFT modules of the CCP4 suite (CCP4, 1994). In order to compute the $F_o - F_c$ omit maps (Figures 4, 6 and 7), 10 cycles of energy minimization and individual B-factor refinement were performed after omitting the ligands from the model. Structure refinement was evaluated using PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993). All structures displayed better values than projected for their resolution limit with respect to all PROCHECK criteria. Figures 4–8 were produced using PyMOL (DeLano, 2002). Solvent-accessible surfaces in Figure 5 were calculated using VOIDOO (Kleywegt, 1994). Parameters and topologies of TCh, ATCh, OTMA and PEG200 were generated using the PRODRG server of Dundee University

Table 1 Data collection and refinement statistics

	TcAChE in complex with OTMA	TcAChE in complex with TCh	TcAChE in complex with ATCh at 20 mM	TcAChE in complex with ATCh at 500 mM
PDB accession code	2C5F	2C5G	2C58	2C4H
ESRF beamline	BM30A	ID14-EH2	ID14-EH2	ID29
Temperature (K)	100	100	100	100
Oscillation step (deg)	1	1	1	1
Number of frames	120	120	120	120
Exposure time (s/frame)	30 (unatt. beam)	2 (unatt. beam)	3 (unatt. beam)	2 (20 × attenuation)
Wavelength (Å)	0.980	0.933	0.933	0.976
Unit cell parameters (Å)				
<i>a</i> = <i>b</i>	112.26	112.52	113.35	111.99
<i>c</i>	137.00	137.37	138.03	137.12
Resolution range (Å)	20.00–2.60 (2.70–2.60) ^a	20.00–1.95 (2.00–1.95)	20.00–2.30 (2.35–2.30)	20.00–2.15 (2.20–2.15)
Completeness (%)	97.8 (97.0)	99.0 (95.6)	100.0 (99.7)	99.6 (98.9)
<i>R</i> _{merge} (%) ^b	8.1 (29.4)	6.4 (49.2)	5.3 (46.9)	5.8 (43.9)
<i>I</i> / <i>σ</i> <i>I</i>	16.12 (5.92)	19.74 (5.30)	22.63 (4.43)	22.14 (4.24)
Unique reflections	30 545	72 944	45 972	54 312
Redundancy	5.99	7.39	7.14	7.34
Observations/parameters ratio	1.45	3.14	2.15	2.45
<i>R</i> _{cryst.} (%)	16.26	16.03	17.14	16.70
<i>R</i> _{free} (%)	21.95	18.60	21.01	20.90
R.m.s.d. bond length (Å)	0.007	0.006	0.006	0.006
R.m.s.d. bond angles (deg)	1.335	1.395	1.335	1.344
R.m.s.d with respect to native structure (Å) (PDB accession code 1EA5)	0.1840	0.1339	0.2123	0.2388
Number of atoms	5249	6003	5341	5543
Protein	4342	4526	4424	4501
Carbohydrate	28	28	28	28
Water	829	1408	822	949
Ligands and ions	50	41	67	65
Wilson <i>B</i> factor (Å ²)	42.6	20.7	38.2	27.9
Average <i>B</i> factor (Å ²)	49.3	38.5	53.0	41.2
Protein	46.1	28.5	48.9	36.3
Carbohydrate	77.0	52.5	74.5	64.0
Water	63.5	61.1	72.0	62.4
Ligands and ions	78.3	64.7	82.8	62.4

ATCh, acetylthiocholine; ESRF, European Synchrotron Radiation Facility; OTMA, 4-oxo-*N,N,N*-trimethylpentanaminium iodide.

^aValues in brackets are for the highest resolution shells.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{i(hkl)} - \langle I_{i(hkl)} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{i(hkl)}$.

(Schuettelkopf and van Aalten, 2004). Refinement statistics are shown in Table 1.

In the OTMA/TcAChE complex, two OTMA molecules could be fitted to the experimental electron density, as evidenced by peaks above 5σ at both the active site and the PAS in the initial *F_o*–*F_c* map. That at the active site had its quaternary group adjacent to Trp84 and its methylcarbonyl moiety positioned near Ser200. An attempt was made to covalently link the OTMA molecule to the catalytic serine (distance of 1.4 Å), as would be the case if a hemiketal had formed (i.e. the tetrahedral intermediate that would form upon binding of OTMA to the catalytic serine) (Harel *et al*, 1996). Subsequent refinement resulted in appearance of a very small negative density peak in the *F_o*–*F_c* map between OTMA and Ser200Oγ. If, instead, a nonbonded interaction was modelled in which the carbonyl carbon of OTMA was moved 2.6 Å away from the Ser200Oγ, a strong positive peak was observed between the two atoms. Hence, the substrate analogue was modelled as covalently linked to the catalytic serine. Even though a symmetry-related TcAChE molecule covers the gorge entrance in the trigonal crystal form, electron density was observed at the PAS, into which another OTMA molecule was modelled. Its quaternary group is adjacent to Trp279, with the 4-oxo-pentyl chain pointing down the gorge.

In order to localize ATCh and TCh in their respective complexes, the level of the initial *F_o*–*F_c* map was raised above 5σ to identify and position the strongly diffracting sulphur atom. Only in the case of the TCh molecule in the CAS of the TCh/TcAChE complex was the electron density of the TMA moiety at a higher sigma level than that of the sulphur atom. No clear peaks were visible in an anomalous difference map that could have reinforced the identification of the sulphur atoms. To unequivocally assign substrate and/or product molecules in the substrate/enzyme complexes, a TCh molecule was

first fitted into the difference density displayed at 3σ, and then added to the model. The TCh molecule was retained if no major residual peaks were detected in the difference map after a round of refinement. In the 500 mM ATCh/TcAChE complex, however, the initial *F_o*–*F_c* positive density in the active site was not straightforwardly interpretable, given its shape and extent. When a TCh molecule was fitted into the density and included in the model, a very strong positive peak appeared in the subsequent *F_o*–*F_c* map, indicating that a molecule larger than TCh is present at that site. When the electron density was displayed at 6σ, only two peaks of density remained. An ATCh molecule was modelled to span them, with its sulphur atom fitted into the strongest and most elongated peak, just below Phe330, and the tetramethylammonium (TMA) moiety into the other one, near Glu199. Models with two molecules in alternate conformations (either two ATCh or two TCh molecules) did not explain the observed electron density convincingly.

Structural data

The coordinates and structure factor amplitudes of the complex structures of TcAChE with the substrate analogue OTMA, the product thiocholine, and the substrate acetylthiocholine at 20 and 500 mM, have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 2c5f, 2c5g, 2c58 and 2c4h, respectively.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

We thank Patricia Amara, Yacov Ashani, Dominique Bourgeois, Otto Dideberg, Adriana Irimia and Antoine Royant for extensive and

productive discussions. We are grateful to Joanne McCarthy, Xavier Vernède, and the staff at the ESRF and the French CRG beam-line FIP for help related to data collection. We thank Fred Vellieux for valuable discussions and critical reading of the manuscript. We are grateful to Lilly Toker for purification of TcAChE, to Maurice Goeldner and Alexandre Specht for a long-term collaboration and to Juan Fontecilla-Camps for regular access to the X-ray source in his laboratory. MW thanks the MINERVA foundation for a short-

term research grant. JPC is supported by a CEA PhD grant. This study benefited from the US Army Medical and Materiel Command under Contract No. DAMD17-97-2-7022, the EC Vth Framework Contracts QLK3-2000-00650 and QLG2-CT-2002-00988 (SPINE), the Kimmelman Center for Biomolecular Structure and Assembly (Rehovot, Israel), the Benozziyo Center for Neurosciences and the Kalman and Ida Wolens Foundation. JLS is the Pickman Professor of Structural Biology.

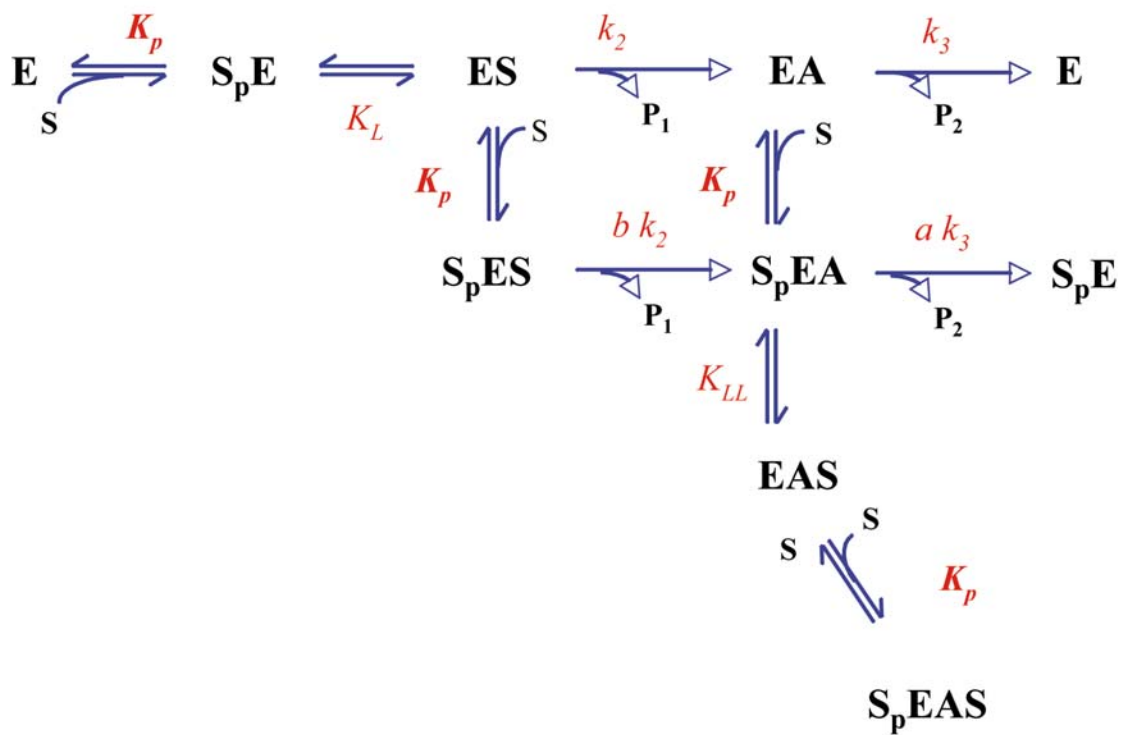
References

- Allen FH, Baalham CA, Lommerse JPM, Raithby PR (1998) Carbonyl-carbonyl interactions can be competitive with hydrogen bonds. *Acta Crystallogr B* **54**: 320–329
- Alles GA, Hawes RC (1940) Cholinesterases in the blood of man. *J Biol Chem* **133**: 375–390
- Barak D, Kronman C, Ordentlich A, Ariel N, Bromberg A, Marcus D, Lazar A, Velan B, Shafferman A (1994) Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J Biol Chem* **269**: 6296–6305
- Belleau B, DiTullio V, Tsai YH (1970) Kinetic effects of leptocurares and pachycurares on the methanesulfonylation of acetylcholinesterase. A correlation with pharmacodynamic properties. *Mol Pharmacol* **6**: 41–45
- Bergmann F, Wilson IB, Nachmansohn D (1950) The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relationship to the active groups of acetylcholine esterase; action of stilbamidine upon nerve impulse conduction. *Biochim Biophys Acta* **6**: 217–224
- Bohme DK, Mackay GI (1981) Bridging the gap between the gas phase and solution: transition in the kinetics of nucleophilic displacement reactions. *J Am Chem Soc* **103**: 978–979
- Bourne Y, Taylor P, Marchot P (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* **83**: 503–512
- Bourne Y, Taylor P, Radic Z, Marchot P (2003) Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J* **22**: 1–12
- Brochier L, Pontie Y, Willson M, Estrada-Mondaca S, Czaplicki J, Klæbe A, Fournier D (2001) Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **276**: 18296–18302
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D* **54**: 905–921
- Changeux JP (1966) Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Mol Pharmacol* **2**: 369–392
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* **50**: 760–763
- Deane CM, Allen FH, Taylor R, Blundell TL (1999) Carbonyl-carbonyl interactions stabilize the partially allowed Ramachandran conformations of asparagines and aspartic acid. *Protein Eng* **12**: 1025–1028
- DeLano WL (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific
- Eastman J, Wilson EJ, Cervenansky C, Rosenberry TL (1995) Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J Biol Chem* **270**: 19694–19701
- Eichler J, Anselmet A, Sussman JL, Massoulie J, Silman I (1994) Differential effects of 'peripheral' site ligands on *Torpedo* and chicken acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol* **45**: 335–340
- Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**: 88–95
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* **60**: 2126–2132
- Eriksson H, Augustinsson KB (1979) A mechanistic model for butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* **567**: 161–173
- Felder CE, Botti SA, Lifson S, Silman I, Sussman JL (1997) External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. *J Mol Graph Model* **15**: 318–327
- Felder CE, Harel M, Silman I, Sussman JL (2002) Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr D* **58**: 1765–1771
- Gibney G, Camp S, Dionne M, MacPhee-Quigley K, Taylor P (1990) Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7546–7550
- Greenblatt HM, Dvir H, Silman I, Sussman JL (2003) Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* **20**: 369–383
- Harel M, Kleywegt GJ, Ravelli RB, Silman I, Sussman JL (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* **3**: 1355–1366
- Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I, Sussman JL (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* **9**: 1063–1072
- Harel M, Quinn DM, Nair HK, Silman I, Sussman JL (1996) The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* **118**: 2340–2346
- Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9031–9035
- Johnson JL, Cusack B, Davies MP, Fauq A, Rosenberry TL (2003) Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. *Biochemistry* **42**: 5438–5452
- Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**: 795–800
- Kleywegt GJ (1994) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallogr D* **50**: 178–185
- Krupka RM, Laidler KJ (1961) Molecular mechanisms for hydrolytic enzyme action. Apparent non-competitive inhibition with special reference to acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* **83**: 1448–1454
- Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A, Kronman C, Barak D, Ariel N, Shafferman A, Silman I, Sussman JL (2000) Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D* **56**: 1385–1394
- Laskowski RA, McArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26**: 283–291
- Madura JD, Jorgensen WL (1986) Ab initio and Monte Carlo calculations for a nucleophilic addition reaction in the gas phase and in aqueous solution. *J Am Chem Soc* **108**: 2517–2527
- Marcel V, Palacios LG, Pertuy C, Masson P, Fournier D (1998) Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem J* **329**: 329–334
- Marty JL, Sode K, Karube I (1992) Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis* **4**: 249–252
- Masson P, Froment MT, Bartels CF, Lockridge O (1996) Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem* **235**: 36–48

- Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I, Sussman JL (1999) Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry* **38**: 7032–7039
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum likelihood method. *Acta Crystallogr D* **53**: 240–255
- Nicolas A, Ferron F, Tokar L, Sussman JL, Silman I (2001) Histochemical method for characterization of enzyme crystals: application to crystals of *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr D* **57**: 1348–1350
- Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* **278**: 41141–41147
- Quinn DM (1987) Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. *Chem Rev* **87**: 955–979
- Radic Z, Duran R, Vellom DC, Li Y, Cervenansky C, Taylor P (1994) Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **269**: 11233–11239
- Radic Z, Gibney G, Kawamoto S, MacPhee-Quigley K, Bongiorno C, Taylor P (1992) Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants. *Biochemistry* **31**: 9760–9767
- Radic Z, Kirchhoff PD, Quinn DM, McCammon JA, Taylor P (1997) Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase. Distinctions between active center ligands and fasciculin. *J Biol Chem* **272**: 23265–23277
- Radic Z, Reiner E, Taylor P (1991) Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol* **39**: 98–104
- Raves ML (1998) Structure–function studies on acetylcholinesterase in space and time. PhD Thesis, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
- Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5128–5132
- Rosenberry TL (1975) Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **43**: 103–218
- Rosenberry TL, Mallender WD, Thomas PJ, Szegletes T (1999) A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate. *Chem Biol Interact* **119–120**: 85–97
- Roufogalis BD, Quist EE (1972) Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol* **8**: 41–49
- Roussel A, Cambillau C (1989) *TURBO-FRODO. Silicon Graphics Geometry Partners Directory*. Mountain View, CA: Silicon Graphics
- Schuettelkopf W, van Aalten DMF (2004) PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallogr D* **60**: 1355–1363
- Shafferman A, Velan B, Ordentlich A, Kronman C, Grosfeld H, Leitner M, Flashner Y, Cohen S, Barak D, Ariel N (1992) Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J* **11**: 3561–3568
- Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **5**: 293–302
- Smissaert HR (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* **143**: 129–131
- Stiles JR, Van Helden D, Bartol Jr TM, Salpeter EE, Salpeter MM (1996) Miniature endplate current rise times less than 100 microseconds from improved dual recordings can be modeled with passive acetylcholine diffusion from a synaptic vesicle. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5747–5752
- Stojan J, Brochier L, Alies C, Colletier JP, Fournier D (2004) Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur J Biochem* **271**: 1364–1371
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Tokar L, Silman I (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872–879
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Varon L, Tokar L, Futerman AH, Silman I (1988) Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Mol Biol* **203**: 821–823
- Szegletes T, Mallender WD, Rosenberry TL (1998) Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry* **37**: 4206–4216
- Taylor P, Lappi S (1975) Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* **14**: 1989–1997
- Thanei-Wyss P, Waser PG (1989) Interaction of quaternary ammonium compounds with acetylcholinesterase: characterization of the active site. *Eur J Pharmacol* **172**: 165–173
- Van der Kloot W, Molgo J, Cameron R, Colasante C (2002) Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. *J Physiol* **541**: 385–393
- Wilson IB (1951) Mechanism of hydrolysis. II. New evidence for an acylated enzyme as intermediate. *Biochim Biophys Acta* **7**: 520–525

Kinetics of ATCh hydrolysis and choice of crystals soaking concentrations

The rate of hydrolysis of ATCh by *TcAChE* as a function of ATCh concentration (Figure 6) was analyzed by multiple non-linear regressions, using the model (Scheme SM1) and equation of Stojan and colleagues (Stojan *et al.*, 2004) and the program GOSA (www.bio-log.biz). This model is the one that best describes the experimental data. The values obtained from the fit for the different kinetic parameters are shown in Table SM1. These parameters were used to estimate the relative proportions of the first and the second substrate-inhibited species as a function of ATCh concentration (Fig. SM2). The first substrate-inhibited species (S_pES) accumulates due to the hampering of choline exit by a substrate molecule at the peripheral anionic site. The second species (S_pEAS) results from the binding of two substrate molecules in the active-site gorge of the acetylated enzyme. The first substrate-inhibition phenomenon has its maximum at ~30 mM ATCh. At 100 mM ATCh, both substrate-inhibited species are populated equally. Substrate concentrations below (20 mM) and above (500 mM) 100 mM were chosen for the crystal soaks, in order to preferentially accumulate either the first or the second substrate-inhibited species.



Scheme SM1 : Kinetic model for ATCh hydrolysis and inhibition in AChE (reproduced from Stojan *et al.*, 2004).

Kinetic parameter	Value	Uncertainty (σ^2)
k_2	65300 sec. ⁻¹	± 48700
k_3	872 sec. ⁻¹	± 49
K_p	136 μ M	± 32
K_L	11.2	± 2.5
K_{LL}	644	144
a	1	0.08
b	0.008	0.002

Table SM1 : Kinetic parameters obtained from fitting the experimental pS curve of *TcAChE* by use of the model and equation described by Stojan and colleagues (Stojan *et al.*, 2004).

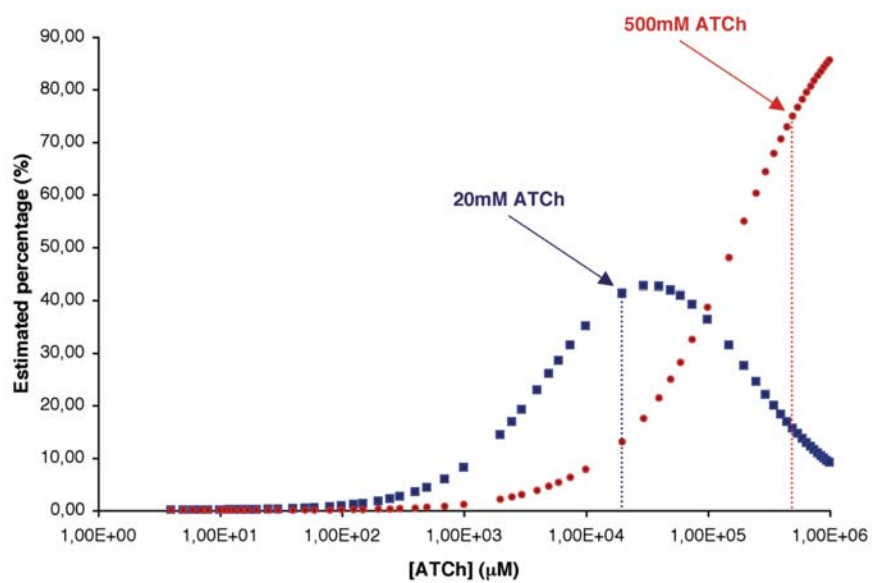


Figure SM2 : Calculated proportions of the two substrate-inhibited species of *TcAChE* as a function of ATCh concentration (blue squares: S_pES, red circles: S_pEAS).

Chapitre VIII :

Références

VIII – Références :

- Adachi S, Park SY, Tame JR, Shiro Y and Shibayama N. (2003) Direct observation of photolysis-induced tertiary structural changes in hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7039-7044.
- Adam V, Royant A, Niviere V, Molina-Heredia FP and Bourgeois D. (2004) Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure*, **12**, 1729-1740.
- Allen FH, Baalham CA, Lommerse JPM, Raithby PR (1998) Carbonyl-carbonyl interactions can be competitive with hydrogen bonds. *Acta Crystallogr B*, **54**, 320-329.
- Alles GA, Hawes RC (1940) Cholinesterases in the blood of man. *J Biol Chem*, **133**, 375-390.
- Alphey MS, Gabrielsen M, Micossi E, Leonard GA, McSweeney SM, Ravelli RB, Tetaud E, Fairlamb AH, Bond CS and Hunter WN. (2003) Tryparedoxins from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: photoreduction of the redox disulfide using synchrotron radiation and evidence for a conformational switch implicated in function. *J Biol Chem*, **278**, 25919-25925.
- Amemiya Y. (1995) Imaging plates for use with synchrotron radiation. *J Synchrotron Radiat*, **2**, 13-21.
- Anderson S, Srajer V and Moffat K. (2004) Structural heterogeneity of cryotrapped intermediates in the bacterial blue light photoreceptor, photoactive yellow protein. *Photochem Photobiol*, **80**, 7-14.
- Arendt T, Bruckner MK, Lange M and Bigl V. (1992) Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms. *Neurochem Int*, **21**, 381-396.
- Auerbach G, Ostendorp R, Prade L, Korndorfer I, Dams T, Huber R and Jaenicke R. (1998) Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*: the crystal structure at 2.1 Å resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. *Structure*, **6**, 769-781.
- Axelsen PH, Harel M, Silman I and Sussman JL. (1994) Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Sci*, **3**, 188-197.
- Ballard CG. (2002) Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur Neurol*, **47**, 64-70.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ and McCammon JA. (2001) Electrostatics of

- nanosystems : application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 10037-10041.
- Barak D, Kronman C, Ordentlich A, Ariel N, Bromberg A, Marcus D, Lazar A, Velan B and Shafferman A. (1994) Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J Biol Chem*, **269**, 6296-6305.
- Barak D, Kaplan D, Ordentlich A, Ariel N, Velan B and Shafferman A. (2002) The aromatic "trapping" of the catalytic histidine is essential for efficient catalysis in acetylcholinesterase. *Biochemistry*, **41**, 8245-8252.
- Bartolucci C, Perola E, Cellai L, Brufani M and Lamba D. (1999) "Back door" opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry*, **38**, 5714-5719.
- Baxter RHG, Seagle BL, Ponomarenko N and Norris JR (2004) Specific radiation damage illustrates light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center. *J Am Chem Soc*, **126**, 16728-16729.
- Belleau B, DiTullio V, Tsai YH (1970) Kinetic effects of leptocurares and pachycurares on the methanesulfonylation of acetylcholinesterase. A correlation with pharmacodynamic properties. *Mol Pharmacol*, **6**, 41-45.
- Benach J, Atrian S, Gonzalez-Duarte R and Ladenstein R. (1998) The refined crystal structure of *Drosophila lebanonensis* alcohol dehydrogenase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **282**, 383-399.
- Benach J, Atrian S, Gonzalez-Duarte R and Ladenstein R. (1999) The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. *J Mol Biol*, **289**, 335-355.
- Benach J, Atrian S, Fibla J, Gonzalez-Duarte R and Ladenstein R. (2000) Structure-function relationships in *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase allozymes ADH(S), ADH(F) and ADH(UF), and distantly related forms. *Eur J Biochem*, **267**, 3613-3622.
- Benach J, Winberg JO, Svendsen JS, Atrian S, Gonzalez-Duarte R and Ladenstein R. (2005) *Drosophila* alcohol dehydrogenase: acetate-enzyme interactions and novel insights into the effects of electrostatics on catalysis. *J Mol Biol*, **345**, 579-598.
- Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szoke H, Henriksen A and Hajdu J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417**, 463-468.
- Bergmann F, Wilson IB, Nachmansohn D (1950) The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relationship to the active groups of acetylcholine

- esterase; action of stilbamidine upon nerve impulse conduction. *Biochim Biophys Acta*, **6**, 217-224.
- Binkowski TA, Naghibzadeh S and Liang J. (2003) CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3352-3355.
- Bohme DK, Mackay GI (1981) Bridging the gap between the gas phase and solution: transition in the kinetics of nucleophilic displacement reactions. *J Am Chem Soc*, **103**, 978-979.
- Botti SA, Felder CE, Lifson S, Sussman JL and Silman II. (1999) A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase. *Biophys J*, **77**, 2430-2450.
- Bourgeois D, Vernède X, Adam V, Fioravanti E & Ursby T (2002) A microspectrophotometer for UV-visible and fluorescence studies of protein crystals. *J Appl Cryst*, **35**, 319-326.
- Bourgeois D, Vallone B, Schotte F, Arcovito A, Miele AE, Sciara G, Wulff M, Anfinrud P and Brunori M. (2003) Complex landscape of protein structural dynamics unveiled by nanosecond Laue crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8704-8709.
- Bourgeois D and Royant A. (2005) Advances in kinetic protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 538-547.
- Bourgeois, D. & Weik, M. (2005). New perspectives in kinetic crystallography using caged compounds. In *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Eds. M. Goeldner, R. Givens), Wiley-vch, Germany
- Bourgeois D, Vallone B, Arcovito A, Sciara G, Schotte F, Anfinrud PA and Brunori M. (2006) Extended subnanosecond structural dynamics of myoglobin revealed by Laue crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4924-4929.
- Bourne Y, Taylor P and Marchot P. (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell*, **83**, 503-512.
- Bourne Y, Taylor P, Bougis PE and Marchot P. (1999) Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. *J Biol Chem*, **274**, 2963-2970.
- Bourne Y, Taylor P, Radic Z and Marchot P. (2003) Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J*, **22**, 1-12.
- Bourne Y, Kolb HC, Radic Z, Sharpless KB, Taylor P and Marchot P. (2004) Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1449-1454.
- Braak H and Braak E. (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta*

- Neurol Scand Suppl*, **165**, 3-12.
- Brady RL and Cameron A. (2004) Structure-based approaches to the development of novel anti-malarials. *Curr Drug Targets*, **5**, 137-149.
- Brochier L, Pontie Y, Willson M, Estrada-Mondaca S, Czaplicki J, Klæbe A and Fournier D. (2001) Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, **276**, 18296-18302.
- Brunger AT. (1993) Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr D*, **49**, 24-36.
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T and Warren GL. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D*, **54**, 905-921.
- Bui JM, Tai K, McCammon JA (2004) Acetylcholinesterase: enhanced fluctuations and alternative routes to the active site in the complex with fasciculin-2. *J Am Chem Soc*, **126**, 7198-7205.
- Burmeister WP. (2000) Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D*, **56**, 328-341.
- Cameron A, Read J, Tranter R, Winter VJ, Sessions RB, Brady RL, Vivas L, Easton A, Kendrick H, Croft SL, Barros D, Lavandera JL, Martin JJ, Risco F, Garcia-Ochoa S, Gamo FJ, Sanz L, Leon L, Ruiz JR, Gabarro R, Mallo A and Gomez de las Heras F. (2004) Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. *J Biol Chem*, **279**, 31429-31439.
- Chaikuad A, Fairweather V, Connors R, Joseph-Horne T, Turgut-Balik D and Brady RL. (2005) Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH. *Biochemistry*, **44**, 16221-16228.
- Chaize B, Colletier JP, Winterhalter M and Fournier D. (2004) Encapsulation of enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, **32**, 67-75.
- Changeux JP (1966) Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Mol Pharmacol*, **2**, 369-392.
- Chiu W, Baker ML, Jiang W, Dougherty M and Schmid MF. (2005) Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution. *Structure*, **13**, 363-372.
- Clery-Barraud C, Ordentlich A, Grosfeld H, Shafferman A and Masson P. (2002) Pressure and heat inactivation of recombinant human acetylcholinesterase. Importance of

- residue E202 for enzyme stability. *Eur J Biochem*, **269**, 4297-4307.
- Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D*, **50**, 760-763.
- Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M and Fournier D. (2002) Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol*, **2**, 9.
- Colletier JP, Sanson B, Nachon F, Gabellieri E, Fattorusso C, Campiani G and Weik M. (2006a) Conformational Flexibility in the Peripheral Site of Torpedo californica Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor. *J Am Chem Soc*, **128**, 4526-4527.
- Colletier JP, Fournier D, Greenblatt HM, Stojan J, Sussman JL, Zaccai G, I. S and Weik M. (2006b) Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J. (sous presse)*
- Colletier JP, Royant A, Sanson B, Specht A, Nachon F, Masson P, Sussman JL, Silman I, Zaccai G, Goeldner M, Bourgeois D, Weik M. Kinetic crystallography on acetylcholinesterase. (2006c) *Manuscript en préparation.*
- Colletier JP and Weik M. (2006d) Exploration structurale du paysage conformationnel de l'acétylcholinestérase par cristallographie cinétique. *Ann. Pharm Fr. (sous presse)*
- Coulson CJ and Rabin BR. (1969) Inhibition of lactate dehydrogenase by high concentrations of pyruvate: The nature and removal of the inhibitor. *FEBS Lett*, **3**, 333-337.
- Darreh-Shori T, Almkvist O, Guan ZZ, Garlind A, Strandberg B, Svensson AL, Soreq H, Hellstrom-Lindahl E and Nordberg A. (2002) Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology*, **59**, 563-572.
- Davidsson P, Blennow K, Andreasen N, Eriksson B, Minthon L and Hesse C. (2001) Differential increase in cerebrospinal fluid-acetylcholinesterase after treatment with acetylcholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **300**, 157-160.
- Davies P and Maloney AJ. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**, 1403.
- Dalziel K and Dickinson FM. (1966) Substrate activation and inhibition in coenzyme-substrate reactions cyclohexanol oxidation catalysed by liver alcohol dehydrogenase. *Biochem J*, **100**, 491-500.

- Deane CM, Allen FH, Taylor R, Blundell TL (1999) Carbonyl-carbonyl interactions stabilize the partially allowed Ramachandran conformations of asparagines and aspartic acid. *Protein Eng*, **12**, 1025-1028.
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Dickinson FM and Dalziel K. (1967) Substrate specificity and stereospecificity of alcohol dehydrogenases. *Nature*, **214**, 31-33.
- Ding X, Rasmussen BF, Petsko GA and Ringe D. (1994) Direct structural observation of an acyl-enzyme intermediate in the hydrolysis of an ester substrate by elastase. *Biochemistry*, **33**, 9285-9293.
- Dodson G and Wlodawer A. (1998) Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci*, **23**, 347-352.
- Doster W, Cusack S & Petry W (1989) Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**, 754-756.
- Dougherty DA. (1996) Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **271**, 163-168.
- Douzou P and Petsko GA. (1984) Proteins at work: "stop-action" pictures at subzero temperatures. *Adv Protein Chem*, **36**, 245-361.
- Drenth JP (1999) *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer-Verlag New-York, New-York, USA.
- Dunn CR, Banfield MJ, Barker JJ, Higham CW, Moreton KM, Turgut-Balik D, Brady RL and Holbrook JJ. (1996) The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design. *Nat Struct Biol*, **3**, 912-915.
- Duval N, Massoulie J and Bon S. (1992) H and T subunits of acetylcholinesterase from Torpedo, expressed in COS cells, generate all types of globular forms. *J Cell Biol*, **118**, 641-653.
- Dym O, Pratt EA, Ho C and Eisenberg D. (2000) The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9413-9418.
- Ealick SE. (2000) Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 495-499.
- Eastman J, Wilson EJ, Cervenansky C and Rosenberry TL. (1995) Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J Biol Chem*, **270**, 19694-

- 19701.
- Edman K, Royant A, Larsson G, Jacobson F, Taylor T, van der Spoel D, Landau EM, Pebay-Peyroula E and Neutze R. (2004) Deformation of helix C in the low temperature L-intermediate of bacteriorhodopsin. *J Biol Chem*, **279**, 2147-2158.
- Eichler J, Anselment A, Sussman JL, Massoulie J and Silman I. (1994) Differential effects of "peripheral" site ligands on Torpedo and chicken acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol*, **45**, 335-340.
- Eisenmesser EZ, Millet O, Labeikovsky W, Korzhnev DM, Wolf-Watz M, Bosco DA, Skalicky JJ, Kay LE and Kern D. (2005) Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, **438**, 117-121.
- Ellis JM. (2005) Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J Am Osteopath Assoc*, **105**, 145-158.
- Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, **7**, 88-95.
- Emsley P and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D*, **60**, 2126-2132.
- Enyedy IJ, Kovach IM, Brooks BR (1998) Alternate pathways for acetic acid and acetate ion release from acetylcholinesterase: a molecular dynamic simulation. *J Am Chem Soc*, **120**, 8043-8050.
- Eriksson H, Augustinsson KB (1979) A mechanistic model for butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*, **567**, 161-173.
- Eszes CM, Sessions RB, Clarke AR, Moreton KM and Holbrook JJ. (1996) Removal of substrate inhibition in a lactate dehydrogenase from human muscle by a single residue change. *FEBS Lett*, **399**, 193-197.
- Faerman C, Ripoll D, Bon S, Le Feuvre Y, Morel N, Massoulie J, Sussman JL and Silman I. (1996) Site-directed mutants designed to test back-door hypotheses of acetylcholinesterase function. *FEBS Lett*, **386**, 65-71.
- Farlow MR. (2002) Cholinesterase inhibitors: relating pharmacological properties to clinical profiles: Introduction. *Int J Clin Pract Suppl*, 1-5.
- Fedorov R, Schlichting I, Hartmann E, Domratcheva T, Fuhrmann M and Hegemann P. (2003) Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: The Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J*, **84**, 2474-2482.
- Felder CE, Botti SA, Lifson S, Silman I, Sussman JL (1997) External and internal

- electrostatic potentials of cholinesterase models. *J Mol Graph and Model*, **15**, 318-327.
- Felder CE, Harel M, Silman I and Sussman JL. (2002) Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr D*, **58**, 1765-1771.
- Fenimore PW, Frauenfelder H, McMahon BH and Young RD. (2004) Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14408-14413.
- Fiedler AT, Halfen HL, Halfen JA and Brunold TC. (2005) Synthesis, structure determination, and spectroscopic/computational characterization of a series of Fe(II)-thiolate model complexes: implications for Fe-S bonding in superoxide reductases. *J Am Chem Soc*, **127**, 1675-1689.
- Fink AL and Petsko GA. (1981) X-ray cryoenzymology. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **52**, 177-246.
- Fioravanti E, Haouz A, Ursby T, Munier-Lehmann H, Delarue M and Bourgeois D. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate kinase: structural studies of intermediates along the reaction pathway. *J Mol Biol*, **327**, 1077-1092.
- Fournier D, Mutero A and Rungger D. (1992a) *Drosophila* acetylcholinesterase. Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem*, **203**, 513-519.
- Fournier D, Bride JM, Hoffmann F, Karch F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. (1992b) *J Biol Chem*, **267**, 14270-14274.
- Frauenfelder H, Sligar SG and Wolynes PG. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**, 1598-1603.
- Fremaux I, Mazeres S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C and Fournier D. (2002) Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem*, **3**, 21.
- Frey PA, Whitt SA and Tobin JB. (1994) A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science*, **264**, 1927-1930.
- Gabel F, Weik M, Doctor BP, Saxena A, Fournier D, Brochier L, Renault F, Masson P, Silman I & Zaccai G (2004) The influence of solvent composition on global dynamics of human butyrylcholinesterase powders: a neutron-scattering study. *Biophys J*, **86**, 3152-3165.
- Gabel F, Weik M, Masson P, Renault F, Fournier D, Brochier L, Doctor BP, Saxena A,

- Silman I & Zaccai G (2005) Effects of soman inhibition and of structural differences on cholinesterase molecular dynamics: a neutron scattering study. *Biophys J.*, **89**, 3303-3311.
- Garman E. (1999) Cool data: quantity AND quality. *Acta Crystallogr D*, **55**, 1641-1653.
- Garman E and Nave C. (2002) Radiation damage to crystalline biological molecules: current view. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 327-328.
- Garman E. (2003) 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 545-551.
- Garman EF and Owen RL. (2006) Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D*, **62**, 32-47.
- Geula C, Greenberg BD and Mesulam MM. (1994) Cholinesterase activity in the plaques, tangles and angiopathy of Alzheimer's disease does not emanate from amyloid. *Brain Res*, **644**, 327-330.
- Giacobini E, Spiegel R, Enz A, Veroff AE and Cutler NR. (2002) Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J Neural Transm*, **109**, 1053-1065.
- Gibney G, Camp S, Dionne M, MacPhee-Quigley K and Taylor P. (1990) Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7546-7550.
- Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I and Sussman JL. (1994) Open "Back Door" in a Molecular Dynamics Simulation of Acetylcholinesterase. *Science*, **263**, 1276-1278.
- Golicnik M, Fournier D and Stojan J. (2001) Interaction of Drosophila acetylcholinesterases with D-tubocurarine: an explanation of the activation by an inhibitor. *Biochemistry*, **40**, 1214-1219.
- Gonzalez A and Nave C. (1994) Radiation damage in protein crystals at low temperature. *Acta Crystallogr D*, **50**, 874-877.
- Gorelick PB, Nyenhuis DL, Garron DC and Cochran E. (1996) Is vascular dementia really Alzheimer's disease or mixed dementia? *Neuroepidemiology*, **15**, 286-290.
- Gottfries CG. (1994) Therapy options in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pract*, **48**, 327-330.
- Greenblatt HM, Dvir H, Silman I, Sussman JL (2003) Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **20**, 369-383.
- Greenblatt HM, Guillou C, Guenard D, Argaman A, Botti S, Badet B, Thal C, Silman I and

- Sussman JL. (2004) The complex of a bivalent derivative of galanthamine with torpedo acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active-site gorge: implications for structure-based drug design. *J Am Chem Soc*, **126**, 15405-15411.
- Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, Lee B, Ingram DK and Lahiri DK. (2001) A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin*, **17**, 159-165.
- Greig NH, Lahiri DK and Sambamurti K. (2002) Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr*, **14**, Suppl 1, 77-91.
- Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC and Mesulam MM. (1997) Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol*, **42**, 909-918.
- Gutfreund H, Cantwell R, McMurray CH, Criddle RS and Hathaway G. (1968) The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme-oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-pyruvate compounds. *Biochem J*, **106**, 683-687.
- Hansen LA and Crain BJ. (1995) Making the diagnosis of mixed and non-Alzheimer's dementias. *Arch Pathol Lab Med*, **119**, 1023-1031.
- Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulie J and Silman I. (1992) Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10827-10831.
- Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I and Sussman JL. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9031-9035.
- Harel M, Kleywegt GJ, Ravelli RB, Silman I and Sussman JL. (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*, **3**, 1355-1366.
- Harel M, Quinn DM, Nair HK, Silman I, Sussman JL (1996) The X-ray Structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc*, **118**, 2340-2346.
- Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I and Sussman JL. (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci*, **9**, 1063-1072.
- Hajdu J, Acharya KR, Stuart DI, Barford D and Johnson LN. (1988) Catalysis in enzyme crystals. *Trends Biochem Sci*, **13**, 104-109.

- Hauptman H. (1997) Phasing methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 672-680.
- Henderson, R. (1990) Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **241**, 6-8.
- Hendrickson WA. (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**, 51-58.
- Hewitt CO, Eszes CM, Sessions RB, Moreton KM, Dafforn TR, Takei J, Dempsey CE, Clarke AR and Holbrook JJ. (1999) A general method for relieving substrate inhibition in lactate dehydrogenases. *Protein Eng*, **12**, 491-496.
- Hiratake J. (2005) Enzyme inhibitors as chemical tools to study enzyme catalysis: rational design, synthesis, and applications. *Chem Rec*, **5**, 209-228.
- Hope H. (1988) Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method. *Acta Crystallogr B*, **44**, 22-26.
- Hope H. (1990) Crystallography of biological macromolecules at ultra-low temperature. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **19**, 107-126.
- Ihee H, Rajagopal S, Srajer V, Pahl R, Anderson S, Schmidt M, Schotte F, Anfinrud PA, Wulff M and Moffat K. (2005) Visualizing reaction pathways in photoactive yellow protein from nanoseconds to seconds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7145-7150.
- Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C and Garrido J. (1996) Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, **16**, 881-891.
- Johnson JL, Cusack B, Davies MP, Fauq A and Rosenberry TL. (2003) Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. *Biochemistry*, **42**, 5438-5452.
- Johnson LN. (1992) Time-resolved protein crystallography. *Protein Sci*, **1**, 1237-1243.
- Juers DH and Matthews BW. (2001) Reversible lattice repacking illustrates the temperature dependence of macromolecular interactions. *J Mol Biol*, **311**, 851-862.
- Kabsch W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst*, **26**, 795-800.
- Kaplan D, Barak D, Ordentlich A, Kronman C, Velan B and Shafferman A. (2004) Is aromaticity essential for trapping the catalytic histidine 447 in human acetylcholinesterase? *Biochemistry*, **43**, 3129-3136.
- Karlsson A, Parales JV, Parales RE, Gibson DT, Eklund H and Ramaswamy S. (2003) Crystal

- structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science*, **299**, 1039-1042.
- Kolb HC, Finn MG and Sharpless KB. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 2004-2021.
- Kovach IM, Qian N and Bencsura A. (1994) Efficient product clearance through exit channels in substrate hydrolysis by acetylcholinesterase. *FEBS Lett*, **349**, 60-64.
- Kleywegt GJ (1994) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallogr D* **50**, 178-185.
- Kleywegt GJ (1995) Dictionaries for Heteros, *ESF/CCP4 Newsletter*, **31**, 45-50.
- Krasinski A, Radic Z, Manetsch R, Raushel J, Taylor P, Sharpless KB and Kolb HC. (2005) In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J Am Chem Soc*, **127**, 6686-6692.
- Kronman C, Ordentlich A, Barak D, Velan B and Shafferman A. (1994) The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **269**, 27819-27822.
- Krupka RM, Laidler KJ (1961) Molecular mechanisms for hydrolytic enzyme action. Apparent non-competitive inhibition with special reference to acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc*, **83**, 1448-1454.
- Kryger G, Silman I and Sussman JL. (1998) Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J Physiol Paris*, **92**, 191-194.
- Kryger G, Silman I and Sussman JL. (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, **7**, 297-307.
- Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A, Kronman C, Barak D, Ariel N, Shafferman A, Silman I and Sussman JL. (2000) Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D*, **56**, 1385-1394.
- Laskowski RA, Moss DS and Thornton JM. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol*, **231**, 1049-1067.
- Lee YS and Krauss M. (2004) Dynamics of proton transfer in bacteriorhodopsin. *J Am Chem Soc*, **126**, 2225-2230.
- Leeson DT and Wiersma DA. (1995) Looking into the energy landscape of myoglobin. *Nat Struct Biol*, **2**, 848-851.

- Leslie AG. (1999) Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D*, **55**, 1696-1702.
- Leslie AG. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **62**, 48-57.
- Lewis WG, Green LG, Grynszpan F, Radic Z, Carlier PR, Taylor P, Finn MG and Sharpless KB. (2002) Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 1053-1057.
- Liang TC and Abeles RH. (1987) Complex of alpha-chymotrypsin and N-acetyl-L-leucyl-L-phenylalanyl trifluoromethyl ketone: structural studies with NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **26**, 7603-7608.
- Lichtenegger H, Doster W, Kleinert T, Birk A, Sepiol B & Vogl G (1999) Heme-solvent coupling: a Mossbauer study of myoglobin in sucrose. *Biophys J*, **76**, 414-422.
- Madern D. (2000) The putative L-lactate dehydrogenase from *Methanococcus jannaschii* is an NADPH-dependent L-malate dehydrogenase. *Mol Microbiol*, **37**, 1515-1520.
- Madern D, Ebel C, Mevarech M, Richard SB, Pfister C and Zaccai G. (2000) Insights into the molecular relationships between malate and lactate dehydrogenases: structural and biochemical properties of monomeric and dimeric intermediates of a mutant of tetrameric L-[LDH-like] malate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, **39**, 1001-1010.
- Madern D, Ebel C, Dale HA, Lien T, Steen IH, Birkeland NK and Zaccai G. (2001) Differences in the oligomeric states of the LDH-like L-MalDH from the hyperthermophilic archaea *Methanococcus jannaschii* and *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry*, **40**, 10310-10316.
- Madern D. (2002) Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *J Mol Evol*, **54**, 825-840.
- Madern D, Cai X, Abrahamsen MS and Zhu G. (2004) Evolution of *Cryptosporidium parvum* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase by a very recent event of gene duplication. *Mol Biol Evol*, **21**, 489-497.
- Madura JD, Jorgensen WL (1986) Ab initio and Monte Carlo calculations for a nucleophilic addition reaction in the gas phase and in aqueous solution. *J Am Chem Soc*, **108**, 2517-2527.
- Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX and Zerlin M. (2001) Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new

- treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, **49**, 279-288.
- Manetsch R, Krasinski A, Radic Z, Raushel J, Taylor P, Sharpless KB and Kolb HC. (2004) In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *J Am Chem Soc*, **126**, 12809-12818.
- Marcel V, Palacios LG, Pertuy C, Masson P and Fournier D. (1998) Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem J*, **329**, 329-334.
- Marchot P, Khelif A, Ji YH, Mansuelle P and Bougis PE. (1993) Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J Biol Chem*, **268**, 12458-12467.
- Marty JL, Sode K, Karube I (1992) Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis*, **4**, 249-252.
- Masson P, Froment MT, Bartels CF and Lockridge O. (1996) Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem*, **235**, 36-48.
- McKeith IG, Burn DJ, Ballard CG, Collerton D, Jaros E, Morris CM, McLaren A, Perry EK, Perry R, Piggott MA and O'Brien JT. (2003) Dementia with Lewy bodies. *Semin Clin Neuropsychiatry*, **8**, 46-57.
- McPherson A. (1976) Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J Biol Chem*, **251**, 6300-6303.
- McPherson A. (2003) *Introduction to macromolecular crystallography*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Mesulam M, Carson K, Price B and Geula C. (1992) Cholinesterases in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **31**, 565-569.
- Mesulam MM and Geula C. (1994) Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol*, **36**, 722-727.
- Mesulam M, Guillozet A, Shaw P and Quinn B. (2002) Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis*, **9**, 88-93.
- Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I and Sussman JL. (1999a) Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry*, **38**, 7032-7039.
- Millard CB, Koellner G, Ordentlich A, Shafferman A, Silman I and Sussman JL. (1999b) Reaction of acetylcholinesterase with VX reveals a mobile histidine in the catalytic

- triad. *J Am Chem Soc*, **121**, 9883-9884.
- Miller MT, Bachmann BO, Townsend CA and Rosenzweig AC. (2002) The catalytic cycle of beta -lactam synthetase observed by x-ray crystallographic snapshots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14752-14757.
- Mishima A and Stanley HE. (1998) The Relationship between Liquid, Supercooled and Glassy Water. *Nature*, **396**, 329-335.
- Mitchell E, Kuhn P and Garman E. (1999) Demystifying the synchrotron trip: a first time user's guide. *Structure*, **7**, R111-121.
- Moffat K. (1989) Time-resolved macromolecular crystallography. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **18**, 309-332.
- Moran MA, Mufson EJ and Gomez-Ramos P. (1993) Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol (Berl)*, **85**, 362-369.
- Morel N, Bon S, Greenblatt HM, Van Belle D, Wodak SJ, Sussman JL, Massoulie J and Silman I. (1999) Effect of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol*, **55**, 982-992.
- Mozzarelli A and Rossi GL. (1996) Protein function in the crystal. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **25**, 343-365.
- Mulder FA, Mittermaier A, Hon B, Dahlquist FW & Kay LE (2001) Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol*, **8**, 932-935.
- Mutero A, Pralavorio M, Simeon V and Fournier D. (1992) Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in Drosophila protein. *Neuroreport*, **3**, 39-42.
- Murray JW, Rudino-Pinera E, Owen RL, Grininger M, Ravelli RB and Garman EF. (2005) Parameters affecting the X-ray dose absorbed by macromolecular crystals. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 268-275.
- Murshudov GN, Vagin AA and Dodson EJ. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D*, **53**, 240-255.
- Nanao MH, Sheldrick GM and Ravelli RB. (2005) Improving radiation-damage substructures for RIP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**, 1227-1237.
- Nanao MH and Ravelli RB. (2006) Phasing macromolecular structures with UV-induced structural changes. *Structure*, **14**, 791-800.
- Nave C and Garman EF. (2005) Towards an understanding of radiation damage in cryocooled macromolecular crystals. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 257-260.

- Nicolas A, Ferron F, Toker L, Sussman JL, Silman I (2001) Histochemical method for characterization of enzyme crystals: application to crystals of *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr D*, **57**, 1348-1350.
- Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC and Nachon F. (2003) Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem*, **278**, 41141-41147.
- Nienhaus GU, Chu K & Jesse K (1998) Structural heterogeneity and ligand binding in carbonmonoxy myoglobin crystals at cryogenic temperatures. *Biochemistry*, **37**, 6819-6823.
- Nienhaus K, Ostermann A, Nienhaus GU, Parak FG and Schmidt M. (2005) Ligand migration and protein fluctuations in myoglobin mutant L29W. *Biochemistry*, **44**, 5095-5105.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J and *et al.* (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, **5**, 197-211.
- O'Neill P, Stevens DL and Garman EF. (2002) Physical and chemical considerations of damage induced in protein crystals by synchrotron radiation: a radiation chemical perspective. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 329-332.
- Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Velan B and Shafferman A. (1993) Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem*, **268**, 17083-17095.
- Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ariel N, Segall Y, Velan B and Shafferman A. (1995) Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, **270**, 2082-2091.
- Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ariel N, Segall Y, Velan B and Shafferman A. (1998) Functional characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, **273**, 19509-19517.
- Ostermann A, Waschipky R, Parak FG & Nienhaus GU (2000) Ligand binding and conformational motions in myoglobin. *Nature*, **404**, 205-208.
- Owen RL, Rudino-Pinera E and Garman EF. (2006) Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4912-4917.

- Parak, F., Knapp, E. W. & Kucheida, D. (1982) Protein dynamics. Mossbauer spectroscopy on deoxymyoglobin crystals. *J Mol Biol*, **161**, 177-194.
- Parak FG and Nienhaus GU. (2002) Myoglobin, a paradigm in the study of protein dynamics. *Chemphyschem*, **3**, 249-254.
- Pebay-Peyroula E, Royant A, Landau EM and Navarro J. (2002) Structural basis for sensory rhodopsin function. *Biochim Biophys Acta*, **1565**, 196-205.
- Peng L, Silman I, Sussman J and Goeldner M. (1996) Biochemical evaluation of photolabile precursors of choline and of carbamylcholine for potential time-resolved crystallographic studies on cholinesterases. *Biochemistry*, **35**, 10854-10861.
- Peng L and Goeldner M. (1998) Photoregulation of cholinesterase activities with caged cholinergic ligands. *Methods Enzymol*, **291**, 265-278.
- Peng L, Nachon F, Wirz J & Goeldner M. (1998) 2-Nitrobenzylarsonium compounds that photorelease heavy-atom cholinergic ligands for time-resolved crystallographic studies on cholinesterases. *Angew Chem Int Ed*, **37**, 2691-2693.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G and Tomlinson BE. (1978a) Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **4**, 273-277.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH and Perry RH. (1978b) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J*, **2**, 1457-1459.
- Petsko GA and Ringe D. (2000) Observation of unstable species in enzyme-catalyzed transformations using protein crystallography. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 89-94.
- Poirier J. (2002) Evidence that the clinical effects of cholinesterase inhibitors are related to potency and targeting of action. *Int J Clin Pract Suppl*, 6-19.
- Quinn DM. (1987) Acetylcholinesterase - Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. *Chem Rev*, **87**, 955-979.
- Radic Z, Reiner E and Taylor P. (1991) Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol*, **39**, 98-104.
- Radic Z, Gibney G, Kawamoto S, MacPhee-Quigley K, Bongiorno C, Taylor P (1992) Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants. *Biochemistry*, **31**, 9760-9767.
- Radic Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S and Taylor P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, **32**, 12074-12084.

- Radic Z, Duran R, Vellom DC, Li Y, Cervenansky C and Taylor P. (1994) Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, **269**, 11233-11239.
- Radic Z, Quinn DM, Vellom DC, Camp S and Taylor P. (1995) Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin. *J Biol Chem*, **270**, 20391-20399.
- Radic Z, Kirchhoff PD, Quinn DM, McCammon JA and Taylor P. (1997) Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase. Distinctions between active center ligands and fasciculin. *J Biol Chem*, **272**, 23265-23277.
- Rajagopal S, Anderson S, Srajer V, Schmidt M, Pahl R and Moffat K. (2005) A structural pathway for signaling in the E46Q mutant of photoactive yellow protein. *Structure*, **13**, 55-63.
- Rasmussen BF, Stock AM, Ringe D & Petsko GA (1992) Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature*, **357**, 423-424.
- Raval DN and Wolfe RG. (1963) Malic dehydrogenase. V. Kinetic studies of substrate inhibition by oxalacetate. *Biochemistry*, **2**, 220-224.
- Ravelli RB, Raves ML, Ren Z, Bourgeois D, Roth M, Kroon J, Silman I and Sussman JL. (1998) Static Laue diffraction studies on acetylcholinesterase. *Acta Crystallogr D*, **54**, 1359-1366.
- Ravelli RB and McSweeney SM. (2000) The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures. *Structure*, **8**, 315-328.
- Ravelli RB, Theveneau P, McSweeney S and Caffrey M. (2002) Unit-cell volume change as a metric of radiation damage in crystals of macromolecules. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 355-360.
- Ravelli RB, Nanao MH, Lovering A, White S and McSweeney S. (2005) Phasing in the presence of radiation damage. *J Synchrotron Radiat*, **12**, 276-284.
- Ravelli RB, Murray J, McGeehan J, Owen RL, Cipriani F, Theveneau P, Weik M and Garman E. (2006) On-line microspectrophotometry at the ESRF ID14-EH4 beamline. *Manuscript in redaction*.
- Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP, Sussman JL. (1997) Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol*, **4**, 57-63.
- Raves ML (1998) Structure-function studies on acetylcholinesterase in space and time. PhD Thesis, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.
- Read JA, Wilkinson KW, Tranter R, Sessions RB and Brady RL. (1999) Chloroquine binds in the cofactor binding site of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *J Biol*

- Chem*, **274**, 10213-10218.
- Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I and Sussman JL. (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5128-5132.
- Rosenberry TL. (1975) Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **43**, 103-218.
- Rosenberry TL, Mallender WD, Thomas PJ and Szegletes T. (1999) A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate. *Chem Biol Interact*, **119-120**, 85-97.
- Rossmann MG and Blow DM. (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr D*, **15**, 24-31
- Roufogalis BD, Quist EE (1972) Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol*, **8**, 41-49.
- Roussel A, Cambillau C. (1989) TURBO-FRODO. Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- Rouso I, Khachatryan E, Gat Y, Brodsky I, Ottolenghi M, Sheves M and Lewis A. (1997) Microsecond atomic force sensing of protein conformational dynamics: implications for the primary light-induced events in bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7937-7941.
- Savini L, Gaeta A, Fattorusso C, Catalanotti B, Campiani G, Chiasserini L, Pellerano C, Novellino E, McKissic D and Saxena A. (2003) Specific targeting of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase recognition sites. Rational design of novel, selective, and highly potent cholinesterase inhibitors. *J Med Chem*, **46**, 1-4.
- Schlichting I, Berendzen J, Chu K, Stock AM, Maves SA, Benson DE, Sweet RM, Ringe D, Petsko GA and Sligar SG. (2000) The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, **287**, 1615-1622.
- Schmidt M, Pahl R, Srajer V, Anderson S, Ren Z, Ihee H, Rajagopal S and Moffat K. (2004) Protein kinetics: structures of intermediates and reaction mechanism from time-resolved x-ray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4799-4804.
- Schmidt M, Ihee H, Pahl R and Srajer V. (2005) Protein-ligand interaction probed by time-resolved crystallography. *Methods Mol Biol*, **305**, 115-154.
- Schneider, TR (2000) Objective comparison of protein structures : error scaled difference distance matrix. *Acta Crystallogr D*, **56**, 714-721.
- Schotte F, Lim M, Jackson TA, Smirnov AV, Soman J, Olson JS, Phillips GN, Jr., Wulff M

- and Anfinsen PA. (2003) Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved x-ray crystallography. *Science*, **300**, 1944-1947.
- Schuettkopf W, van Aalten DMF (2004) PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D*, **60**, 1355-1363.
- Shafferman A, Velan B, Ordentlich A, Kronman C, Grosfeld H, Leitner M, Flashner Y, Cohen S, Barak D, Ariel N (1992a) Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J*, **11**, 3561-3568.
- Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Grosfeld H, Ordentlich A, Gozes Y, Cohen S, Ariel N and Barak D. (1992b) Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J Biol Chem*, **267**, 17640-17648.
- Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ber R, Bino T, Ariel N, Osman R and Velan B. (1994) Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. *EMBO J*, **13**, 3448-3455.
- Shen T, Tai K, Henchman RH and McCammon JA. (2002) Molecular dynamics of acetylcholinesterase. *Acc Chem Res*, **35**, 332-340.
- Shi MA, Lougarre A, Alies C, Fremaux I, Tang ZH, Stojan J and Fournier D. (2004) Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol*, **4**, 5.
- Silman I and Sussman JL. (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, **5**, 293-302.
- Smissaert HR (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*, **143**, 129-131.
- Specht A, Ursby T, Weik M, Peng L, Kroon J, Bourgeois D and Goeldner M (2001) Cryophotolysis of ortho-nitrobenzyl derivatives of enzyme ligands for the potential kinetic crystallography of macromolecules. *Chembiochem*, **2**, 845-848.
- Stiles JR, Van Helden D, Bartol TM Jr, Salpeter EE, Salpeter MM (1996) Miniature endplate current rise times less than 100 microseconds from improved dual recordings can be modeled with passive acetylcholine diffusion from a synaptic vesicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5747-5752.
- Stoddard BL, Koenigs P, Porter N, Petratos K, Petsko GA and Ringe D. (1991) Observation of the light-triggered binding of pyrene to chymotrypsin by Laue x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5503-5507.

- Stoll VS, Kimber MS and Pai EF. (1996) Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase. *Structure*, **4**, 437-447.
- Stojan J, Brochier L, Alies C, Colletier JP and Fournier D. (2004) Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur J Biochem*, **271**, 1364-1371.
- Subramaniam S and Henderson R. (1999) Electron crystallography of bacteriorhodopsin with millisecond time resolution. *J Struct Biol*, **128**, 19-25.
- Sugishima M, Sakamoto H, Noguchi M and Fukuyama K. (2004) CO-trapping site in heme oxygenase revealed by photolysis of its co-bound heme complex: mechanism of escaping from product inhibition. *J Mol Biol*, **341**, 7-13.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Varon L, Toker L, Futerman AH, Silman I (1988) Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Mol Biol*, **203**, 821-823.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L and Silman I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **253**, 872-879.
- Szegletes T, Mallender WD and Rosenberry TL. (1998) Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry*, **37**, 4206-4216.
- Tai K, Shen T, Borjesson U, Philippopoulos M and McCammon JA. (2001) Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase. *Biophys J*, **81**, 715-724.
- Tai K, Shen T, Henchman RH, Bourne Y, Marchot P and McCammon JA. (2002) Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *J Am Chem Soc*, **124**, 6153-6161.
- Taylor P, Lappi S (1975) Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry*, **14**, 1989-1997.
- Taylor P and Radic Z. (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **34**, 281-320.
- Tehei M, Madern D, Franzetti B and Zaccai G. (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J Biol Chem*, **280**, 40974-40979.
- Teng T (1990) Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing

- thin film. *J Appl Cryst*, **23**, 387-391.
- Thanei-Wyss P, Waser PG (1989) Interaction of quaternary ammonium compounds with acetylcholinesterase: characterization of the active site. *Eur J Pharmacol*, **172**, 165-173.
- Theisen MJ, Misra I, Saadat D, Campobasso N, Mizioroko HM and Harrison DH. (2004) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase intermediate complex observed in "real-time". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16442-16447.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Sabbagh MN, Schoos B, Masliah E, Thal LJ and Corey-Bloom J. (2000) Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology*, **54**, 407-411.
- Tobi D and Bahar I. (2005) Structural changes involved in protein binding correlate with intrinsic motions of proteins in the unbound state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18908-18913.
- Tohgi H, Abe T, Kimura M, Saheki M and Takahashi S. (1996) Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia. *J Neural Transm*, **103**, 1211-1220.
- Ursby, T., Weik, M., Fioravanti, E., Delarue, M., Goeldner, M. & Bourgeois, D. (2002) Cryophotolysis of caged compounds: a technique for trapping intermediate states in protein crystals. *Acta Crystallogr D*, **58**, 607-614.
- Van der Kloot W, Molgo J, Cameron R, Colasante C (2002) Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. *J Physiol*, **541**, 385-393.
- Velan B, Barak D, Ariel N, Leitner M, Bino T, Ordentlich A and Shafferman A. (1996) Structural modifications of the omega loop in human acetylcholinesterase. *FEBS Lett*, **395**, 22-28.
- Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S and Taylor P. (1993) Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, **32**, 12-17.
- Verdonk ML, Boks GJ, Kooijman H, Kanters JA and Kroon J. (1993) Stereochemistry of charged nitrogen-aromatic interactions and its involvement in ligand-receptor binding. *J Comput Aided Mol Des*, **7**, 173-182.

- Vernede X, Lavault B, Ohana J, Nurizzo D, Joly J, Jacquamet L, Felisaz F, Cipriani F and Bourgeois D. (2006) UV laser-excited fluorescence as a tool for the visualization of protein crystals mounted in loops. *Acta Crystallogr D*, **62**, 253-261.
- Wang J and El-Sayed MA. (1999) Temperature jump-induced secondary structural change of the membrane protein bacteriorhodopsin in the premelting temperature region: a nanosecond time-resolved Fourier transform infrared study. *Biophys J*, **76**, 2777-2783.
- Wang Y, Baskin JS, Xia T and Zewail AH. (2004) Human myoglobin recognition of oxygen: dynamics of the energy landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 18000-18005.
- Weik M, Ravelli RB, Kryger G, McSweeney S, Raves ML, Harel M, Gros P, Silman I, Kroon J and Sussman JL. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 623-628.
- Weik, M., Kryger, G., Schreurs, A. M., Bouma, B., Silman, I., Sussman, J. L., Gros, P. & Kroon, J. (2001a) Solvent behaviour in flash-cooled protein crystals at cryogenic temperatures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 566-573.
- Weik M, Ravelli RB, Silman I, Sussman J L, Gros P & Kroon J. (2001b) Specific protein dynamics near the solvent glass transition assayed by radiation-induced structural changes. *Protein Sci*, **10**, 1953-1961.
- Weik M, Berges J, Raves ML, Gros P, McSweeney S, Silman I, Sussman JL, Houee-Levin C and Ravelli RB. (2002) Evidence for the formation of disulfide radicals in protein crystals upon X-ray irradiation. *J Synchrotron Radiat*, **9**, 342-346.
- Weik M, Vernede X, Royant A & Bourgeois D. (2004) Temperature derivative fluorescence spectroscopy as a tool to study dynamical changes in protein crystals. *Biophys J*, **86**, 3176-3185.
- Weik M. (2006) Dynamique des protéines et dynamique de l'eau d'hydratation. Habilitation à Diriger des Recherches, Université Joseph Fourier – Grenoble I, Grenoble, France.
- Westbrook EM and Naday I. (1997) Charge-coupled device-based area detectors. *Methods Enzymol*, **276**, 244-268.
- White HA, Coulson CJ, Kemp CM and Rabin BR. (1973) The presence of lactic acid in purified lactate dehydrogenase. *FEBS Lett*, **34**, 155-158.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT and Delon MR. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, **215**, 1237-1239.
- Wilmouth RC, Clifton IJ, Robinson CV, Roach PL, Aplin RT, Westwood NJ, Hajdu J and Schofield CJ. (1997) Structure of a specific acyl-enzyme complex formed between

- beta-casomorphin-7 and porcine pancreatic elastase. *Nat Struct Biol*, **4**, 456-462.
- Wilson IB (1951) Mechanism of hydrolysis. II. New evidence for an acylated enzyme as intermediate. *Biochim Biophys Acta*, **7**, 520-525.
- Winberg JO and McKinley-McKee JS. (1994) *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase: product-inhibition studies. *Biochem J*, **301**, 901-909.
- Winter VJ, Cameron A, Tranter R, Sessions RB and Brady RL. (2003) Crystal structure of *Plasmodium berghei* lactate dehydrogenase indicates the unique structural differences of these enzymes are shared across the *Plasmodium* genus. *Mol Biochem Parasitol*, **131**, 1-10.
- Xu Y, Shen J, Luo X, Silman I, Sussman JL, Chen K, Jiang H. (2003) How does huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? Steered molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc*, **125**, 11340-9.
- Yamashita A, Endo M, Higashi T, Nakatsu T, Yamada Y, Oda J and Kato H. (2003) Capturing enzyme structure prior to reaction initiation: tropinone reductase-II-substrate complexes. *Biochemistry*, **42**, 5566-5573.

Résumé :

L'acétylcholinestérase est une enzyme très rapide, essentielle à la neurotransmission cholinergique. Elle est la cible de toutes les molécules actuellement utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, et les progrès à venir dans la modulation de son activité réclament une connaissance plus fine de sa structure et de sa dynamique.

Dans cette thèse, nous décrivons trois approches expérimentales ayant permis d'obtenir des informations structurales sur la dynamique de l'acétylcholinestérase. Nous rapportons, dans un premier temps, la structure de cette enzyme en complexe avec un putatif médicament anti-Alzheimer de seconde génération. Nous décrivons, par ailleurs, une approche de mise à l'équilibre réactionnel de complexes enzyme/substrat cristallins, grâce à laquelle le trafic des substrats au sein de l'acétylcholinestérase a pu être suivi structuralement. Nous présentons, enfin, le développement d'une stratégie nouvelle en cristallographie cinétique des protéines, basée sur l'utilisation d'un précurseur photosensible du produit de réaction enzymatique, sa photolyse *in-crystallo* par le biais d'un laser, et l'application subséquente de profils de température adéquats afin de permettre la survenue des mouvements moléculaires nécessaires à l'expulsion des produits de photolyse.

Prises conjointement, les différents résultats de cette thèse permettent une description détaillée du trafic des substrats et produits au sein de l'acétylcholinestérase, et fournissent un aperçu structural de son paysage conformationnel.

Mots-clefs : acétylcholinestérase – paysage conformationnel – trafic de substrats et produits – cristallographie cinétique – maladie d'Alzheimer.

Summary :

Acetylcholinesterase is a very rapid enzyme, essential in the process of nerve impulse transmission at cholinergic synapses. It is the target of all currently approved anti-Alzheimer drugs and further progress in the modulation of its activity requires structural as well as dynamical information.

Here we report three experimental approaches that allowed to gain structural insight into the dynamics of acetylcholinesterase. First, the structure of its complex with a putative second-generation anti-Alzheimer drug is presented. Next, a steady-state approach for determining atomic-resolution structures of enzyme/substrate complexes is detailed, which allowed to structurally follow the traffic of substrates within the active site of the acetylcholinesterase. Lastly, a new kinetic-crystallography strategy is described, in which a photolabile precursor of the enzymatic product is cleaved in-crystallo by means of UV-laser irradiation, and the molecular motions necessary for the expulsion of photolysis products to occur triggered by temperature-controlled X-ray crystallography.

Taken together, the results described herein permit a detailed description of the traffic of substrates and products within acetylcholinesterase, and provide insights into its conformational energy landscape.

Keywords : acetylcholinesterase – conformational energy landscape – substrates and products traffic – kinetic crystallography – Alzheimer disease.